

**Aufnahme von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q in  
humane embryonale Nierenzellen und intrazelluläre Sortierung**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Alexandra Pierskalla  
geb. am 27.08.1977 in Halle/Saale

**Gutachter**

1. Prof. Dr. Nissler, Jena
2. Prof. Dr. Halbhuber, Jena
3. Prof. Dr. Saftig, Kiel

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2004

## Verzeichnis der Abkürzungen

bkg	Hintergrund
AS	Aminosäuren
BSA	bovine serum albumin
[ <sup>14</sup> C]	radioaktiv markierter Kohlenstoff
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTSSP	3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidyl-propionat]
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat-2-hydrat
FKS	Fötales Kälberserum
HEK 293-Zellen	humane embryonale Nierenzell-Linie 293
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MW	molecular weight
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RPMI	Ross Park Memorial Institute
[ <sup>35</sup> S]	radioaktiv markierter Schwefel
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris (hydroxy-methyl)-methylaminomethan

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1. Endosomale und lysosomale Kompartimente	3
2.2. Synthese und Sortierung lysosomaler Enzyme	8
2.3. Bedeutung lysosomaler Enzyme	11
2.4. Aufbau und Funktion von Cathepsin S	13
2.5. Alternative Sortierung von lysosomalen Enzymen	15
2.6. Zielstellung der Arbeit	18
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1. Chemikalien	19
3.2. Puffer	20
3.2.1. phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung (PBS)	20
3.2.2. Puffer A	20
3.2.3. Imidazol-Saccharose-Puffer	20
3.2.4. Homogenisierungspuffer	21
3.2.5. SDS-Elektrophorese-Probenpuffer (5fach)	21
3.2.6. SDS-Elektrophorese-Puffer	21
3.3. Zell-Linien und Zellkultivierung	21
3.3.1. Zell-Linien	21
3.3.2. Kultivierung und Passagierung	22
3.4. Herstellung und Markierung von Procathepsin S, Procathepsin S-N104Q und Cathepsin S	22
3.4.1. Radioaktive Markierung mit [ <sup>35</sup> S]Methionin	22
3.4.2. Markierung durch Biotinylierung	25
3.4.2.1. Biotinylierung von Wildtyp-Procathepsin S und Procathepsin S-N104Q	25
3.4.2.2. Biotinylierung von reifem Cathepsin S	25
3.5. Gewinnung der Medien und Zellextrakt nach Endocytoseexperimenten	26
3.6. Immunpräzipitation	26
3.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
3.8. Auswertung der Elektropherogramme der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	28
3.8.1. Autoradiographie	28

3.8.2. Silberfärbung der Elektropherogramme	29
3.8.3. Westernblot	29
3.8.3.1. Auswertung von Westernblots mit Farbreaktion	30
3.8.3.2. Auswertung von Westernblots mit dem ECL-System	30
3.8.3.3. Auswertung von Westernblots von biotinylierten Cathepsin S-Formen durch das ECL-System	30
3.9. Endocytoseuntersuchungen von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S, [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q, biotinyliertem Procathepsin S und reifem Cathepsin S	31
3.10. Bindungsexperimente von Procathepsin S-N104Q an Membranen intakter HEK 293-Zellen	31
3.11. Zellfraktionierung	33
3.11.1. Herstellung des postnukleären Überstandes	33
3.11.2. Percoll-Gradienten-Zentrifugation	33
3.11.3. Lysosomenpräparation	34
3.12. Leitenzymbestimmung	34
3.12.1. Bestimmung der $\beta$ -Hexosaminidase	34
3.12.2. Bestimmung der Phosphatidyl-Inositol-4-Kinaseaktivität	35
3.13. Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.13.1. Microbiuretmethode	35
3.13.2. Micro BCA Protein-Bestimmung	36
3.14. Bestimmung der Triton X100-Konzentration durch Fluorimetrie	36
<b>4. Ergebnisse</b>	37
4.1. Reinigung von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q	37
4.1.1. Gewinnung des Procathepsin S-N104Q	37
4.1.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie von Procathepsin S-N104Q an Phenylsepharose HiLoad 16/10	37
4.1.2.1. Versuche zur Entfernung des Triton X100 aus dem Procathepsin S-N104Q-Präparat nach Phenylsepharose-Chromatographie	39
4.1.2.2. Gelchromatographie von Procathepsin S-N104Q nach Phenylsepharose-Chromatographie an HiLoad 16/60 Superdex G75	42
4.1.3. Gelchromatographie von Procathepsin S-N104Q an HiLoad 26/60 Superdex G75	43
4.2. Konzentrierung von Procathepsin S-N104Q	44
4.3. Endocytose von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen	45

4.3.1.	Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Endocytose	45
4.3.2.	Abhängigkeit der Endocytose von der Inkubationszeit	46
4.3.3.	Abhängigkeit der Endocytose von der [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q-Konzentration	49
4.4.	Endocytose von [ <sup>35</sup> S]markiertem Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen an nicht markiertem Procathepsin S-N104Q	50
4.4.1	Bestimmung der Procathepsin S-N104Q-Konzentration mit Hilfe des ECL-Systemes	50
4.4.2.	Kompetitionsuntersuchungen von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q und nicht markiertem Procathepsin S-N104Q um Bindung an ein Membranmotiv	51
4.5.	Endocytose von reifem Cathepsin S durch HEK 293-Zellen	54
4.6.	Nachweis von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q in Lysosomen	56
4.7.	Ultrastrukturelle Untersuchung der subzellulären Verteilung von glycosyliertem und nicht glycosyliertem Procathepsin S in HEK 293-Zellen	57
4.8.	Untersuchungen zur Bindung von [ <sup>35</sup> S]markiertem Procathepsin S-N104Q an Membranen von HEK 293-Zellen	60
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	65
5.1.	Untersuchungen zur Spezifität der Bindung von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q an HEK 293-Zellen	65
5.2.	Ultrastrukturelle Untersuchung zur Membranlokalisation von nicht glycosyliertem Procathepsin S	73
5.3.	Nachweis von potentiellen Bindungsproteinen für Procathepsin S-N104Q in Membranen von HEK 293-Zellen	76
<b>6.</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	85
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	86
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	88
	<b>Literaturverzeichnis</b>	
	<b>Anhang</b>	

## 1. Zusammenfassung

Die Sortierung von Proteinen in das endosomale bzw. lysosomale Kompartiment erfolgt rezeptorabhängig durch das Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignal der lysosomalen Proteine. Nach Fusion der enzymhaltigen Transportvesikel mit den Endosomen dissoziiert aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Protein-Mannose-6-Phosphat-Rezeptorkomplex. Neben diesem Mechanismus wird für verschiedene lysosomale Proteine ein alternativer Sortierungsweg postuliert. Die Identifikation eines Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Membranbindungsmotives ist bisher noch nicht gelungen.

Eine Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierung in die Lysosomen wurde auch für die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin S postuliert. HEK 293-Zellen, die kein Cathepsin S exprimieren, wurden mit der Procathepsin S-cDNA transfiziert, bei der die einzige Glycosylierungsstelle in der Proregion durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt worden war. Mit diesem exprimierten, nicht glycosylierten Procathepsin S-N104Q wurde die Endocytose und Sortierung in die Lysosomen der HEK 293-Zellen bewiesen (Nissler et al., 1998).

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des postulierten Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungsmechanismus für Procathepsin S und Versuche zur Identifikation eines Membranbindungsmotives in der Plasmamembran von HEK 293-Zellen für dieses Enzym.

Mit [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q wurde die Bindung an naive HEK 293-Zellen nach einer Inkubationszeit von 8 h bei 2°C nachgewiesen. Neben der Bindung fand bei 37°C die Endocytose und Sortierung in die Lysosomen statt, wie durch die Immunpräzipitation von Procathepsin S-N104Q und reifem Cathepsin S aus Zellextrakten bewiesen wurde.

Die Untersuchung der Endocytose von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ergab, dass bei 37°C bereits nach 15 min das Proenzym im Zellextrakt nachweisbar war. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde erreicht der Precursor die Lysosomen, was durch Auftreten von reifem Cathepsin S angezeigt wurde. Nach 2 Stunden war die Menge an gebundenem und internalisiertem Procathepsin S-N104Q über einen Zeitraum von weiteren 6 Stunden konstant, während die intrazelluläre Menge an reifem Cathepsin S stetig anstieg.

Die Untersuchung der Endocytose von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-Konzentration lässt eine Tendenz zur Sättigung der Aufnahme von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q erkennen.

Die Untersuchung der Endocytose von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q in Gegenwart steigender Konzentrationen von nicht markiertem Procathepsin S-N104Q zeigten kompetitive

Verhältnisse der Bindung bzw. Aufnahme des nicht glycosylierten Procathepsin S-N104Q um ein Membranbindungsmotiv. Diese Untersuchungen erforderten die Gewinnung größerer Mengen an gereinigtem, nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q. Hierfür wurde das für die Reinigung von glycosyliertem Procathepsin S entwickelte Verfahren modifiziert. Die Bestimmung der Procathepsin S-N104Q-Konzentrationen in den für die Konkurrenzexperimente eingesetzten Medien erfolgte durch den ECL-Nachweis nach Westernblotting unter Zuhilfenahme von gereinigtem Wildtyp-Procathepsin S als Eichsubstanz. Mit steigender Procathepsin S-N104Q-Konzentration sank die Bindung bzw. die Endocytose von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q.

Zur Lokalisationbestimmung des alternativen Sortierungsmotives im Procathepsin S-N104Q-Molekül wurden Endocytoseexperimente an HEK 293-Zellen mit Procathepsin S und reifem Cathepsin S durchgeführt, die zeigten, dass im Gegensatz zu Procathepsin S reifes Cathepsin S nicht von HEK 293-Zellen endocytiert wird. Das führt zu dem Schluss, dass das Bindungsmotiv für die Mannose-6-Phosphat-unabhängige Bindung von Procathepsin S-N104Q an HEK 293-Zellmembranen im Propeptidanteil des Procathepsin S-N104Q-Moleküles lokalisiert ist.

Mit immunhistochemischen Ultrastrukturuntersuchungen von HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q exprimierten, wurde die Membranlokalisation (Plasma- und Lysosomenmembran) von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q bewiesen. In den Lysosomen dieser Zellen kamen deutliche Cathepsin S-spezifische Signale zur Darstellung. Damit bestätigen die ultrastrukturellen Untersuchungen die Ergebnisse der Endocytoseexperimente. Im Extrakt isolierter Lysosomen sowie in Lysosomenmembranpräparationen dieser Zellen wurden mit Immunpräzipitation sowohl Procathepsin S als auch reifes Cathepsin S nachgewiesen.

Zur Identifikation eines Membranbindungsmotives wurde der gebildete Komplex von Procathepsin S-N104Q und einem Membranprotein nach Inkubation der HEK 293-Zellen mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q mit dem Crosslinker DTSSP stabilisiert. Nach Membranpräparation durch Percoll-Gradienten-Zentrifugation und nachfolgender Immunpräzipitation wurden in der SDS-PAGE zahlreiche hochmolekulare [<sup>35</sup>S]markierte Banden erkennbar. Nach Spaltung des Crosslinkers wurde [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q detektiert. Es ist wahrscheinlich, dass sich unter den dargestellten hochmolekularen Banden das Membranbindungsprotein befindet, welches Procathepsin S-N104Q Mannose-6-Phosphat-unabhängig bindet.

Mit diesem Versuchsansatz sollte es möglich sein, das Bindungsmotiv bei seiner Isolierung aus der Membranpräparation zu identifizieren.



## **2. Einleitung**

### **2.1. Endosomale und lysosomale Kompartimente**

Die endocytotischen Kompartimente bestehen aus verschiedenen Gruppen von Vesikeln: man unterscheidet frühe Endosomen (early endosomes), späte Endosomen (late endosomes, Prelysosomen, Lysosomen mit geringer Dichte) und reife Lysosomen (Lysosomen mit hoher Dichte). Jene Vesikel sind in unterschiedlichem Ausmaß mit hydrolytischen Enzymen differenter Spezifität ausgestattet, die sich am proteolytischen Abbau endogener und exogener Proteine beteiligen. Die morphologisch und funktionell ähnlichen Organellen divergieren in ihrem pH-Wert (Schmid et al., 1989), in ihrer Enzymausstattung (Schmid et al., 1988, Ludwig et al., 1991 Claus et al., 1998) sowie in Funktion und Sequenz ihrer Entstehung als auch in ihrer Substratverwertung (Tjelle et al., 1996).

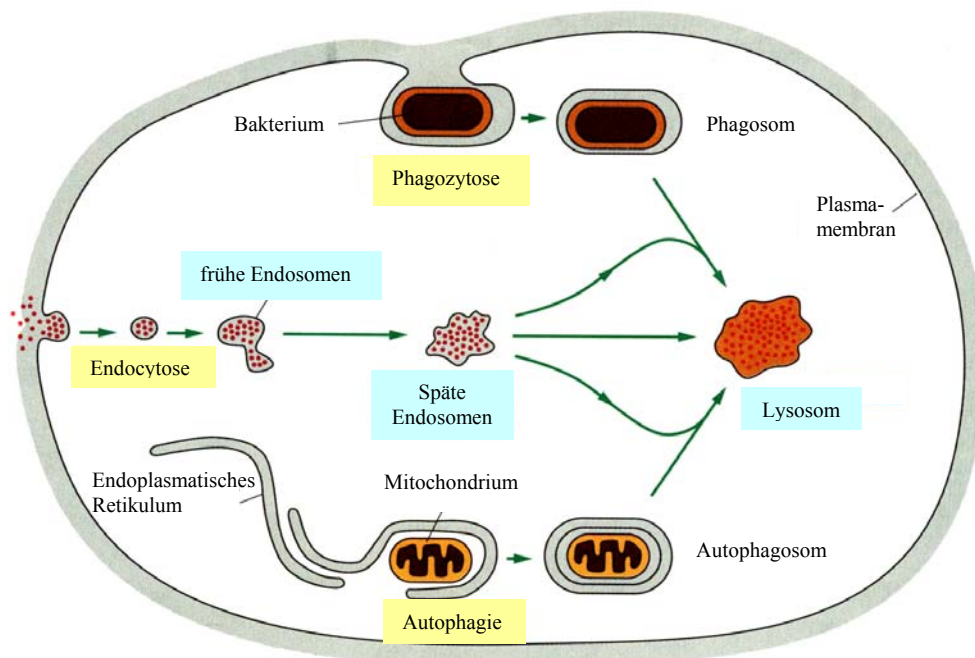
Die frühen Endosomen bilden das erste endocytotische Kompartiment; sie enthalten Fremdmaterialien, welche rezeptorvermittelt oder durch „fluid phase“ Endocytose in die Zelle gelangt sind (Berg et al., 1995). Infolge des intravesikulären pH-Wertes von 6,2-6,5 können endocytisiertes Material, z.B. Insulin und Rezeptor dissoziieren (Borden et al., 1990); der Rezeptor kann anschließend zur Zelloberfläche rezyklisieren, wo er einen erneuten Endocytosevorgang von Fremdmaterial ermöglicht (Ludwig et al., 1991, Mellmann, 1996). Spätere prä-/lysosomale Kompartimente, insbesondere die Lysosomen, sind nicht mehr an der rezeptorvermittelten Endocytose beteiligt (Pillay et al., 2002). In die Lysosomen gelangen zellfremde Materialien auf dem Wege der Phagozytose (Funato et al., 1997) und zelleigene, teils funktionsuntüchtige Zellbestandteile (Mitochondrien, Proteine, Lipide, DNA) durch Autophagie (Lawrence und Brown, 1992) (Abb. 1). Cytosolische Proteine passieren die Lysosomenmembran durch Carrier-vermittelten Transport (Cuervo und Dice, 1996).

Die frühen Endosomen enthalten bereits hydrolytische Enzyme, die durch Fusion mit Transportvesikeln des Golgi-Apparates in die Endosomen gelangt sind (Schmid et al., 1988, Ludwig et al., 1991, Rijnboutt et al., 1992). Für den Transport von endocytisiertem Material von den frühen in die späten Endosomen gibt es verschiedene Theorien. Murphy (1991), Dunn und Maxfield (1992) postulierten ein Reifungsmodell, bei dem jede beteiligte Organelle in die nächstreichere/nächsthöhere, proteolytisch aktivere Organelle durch Reifung überführt werden kann. Während des Reifungsprozesses können jederzeit neue Bestandteile, wie z.B. Hydrolasen oder Glycoproteine durch Vesikeltransport und -fusion eintransportiert werden, ebenso können wiederverwertbare Materialien die Endosomen über Carriervesikel verlassen. In einem anderem Modell, dem Vesikel-shuttle-Modell von Griffiths und Gruenberg (1991)

fungieren die einzelnen Organellen als eigenständige Kompartimente, die untereinander über Vesikeltransport kommunizieren (Griffiths, 1996, Gu und Gruenberg, 1999). Es wird angenommen, dass endosomale Transportvesikel, die teilweise auch als „multivesikuläre bodies“ bezeichnet werden, unter anderem für den Transfer von abzubauenen Materialien von den frühen zu den späten Endosomen verantwortlich sind (Gruenberg et al., 1989, Griffiths, 1996, Pillay et al., 2002).

Auch eine Kombination beider Modelle erscheint möglich (Thilo et al., 1995).

An Makrophagen konnte gezeigt werden, dass eine direkte Fusion zwischen frühen und späten Endosomen zum Austausch der abzubauenen Materialien möglich ist (Jahraus et al., 1998).



**Abb. 1: Abzubauenes Material gelangt auf 3 Wegen in das prälysosomale / lysosomale Kompartiment**

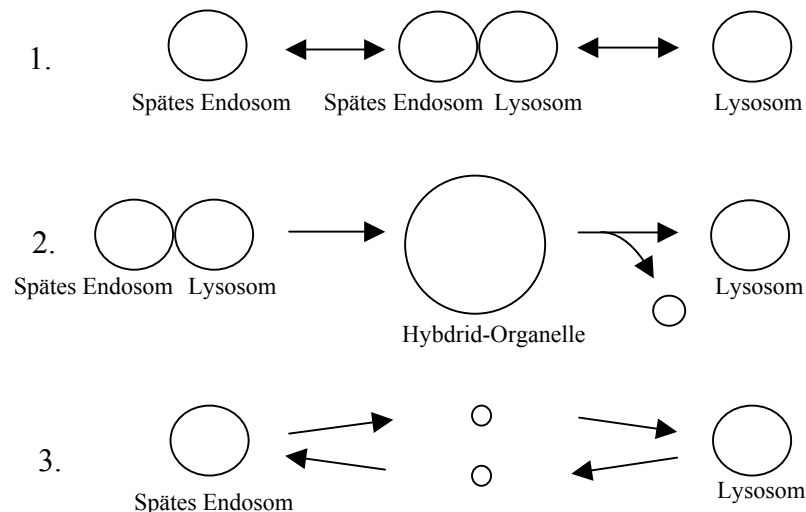
Endocytose, Phagozytose, Autophagie

Nach Alberts et al. 1994 "Molecular biology of the cell"

Die Transportzeit der Materialien von Beginn der Endocytose einschließlich der Verteilung zwischen den einzelnen endosomalen/lysosomalen Kompartimenten beträgt 5-30 min, sie variiert zwischen den einzelnen Zelltypen, den Kultivierungsbedingungen (Zellkultur oder Gewebeverband), den Substraten und der Herkunft der Substrate (biosynthetischer oder endocytotischer Transfer) (Mullock et al., 1994, Akasaki et al., 1996, Luzio et al., 2001). Die späten Endosomen unterscheiden sich von den frühen Endosomen durch einen niedrigeren pH-Wert und durch eine differenter Enzymausstattung. Die unterschiedlichen intravesikulären Protonenkonzentration werden durch ATP-abhängige Protonenpumpen der prälysosomalen/

lysosomalen Membran, die energieabhängig Protonen in das Innere der Organelle einschleusen, aufrechterhalten. Auch in diesem Kompartiment befinden sich Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (Griffiths et al. 1990), die zum Golgi-Apparat rezyklisieren können (Hirst et al., 1996).

Für den Transfer der Substrate von den späten Endosomen in die Lysosomen werden ebenfalls verschiedene Möglichkeiten beschrieben (Abb. 2).



**Abb. 2: Substratfluss in die Lysosomen nach Luzio et al., 2000**

1. „kiss und run“-Modell
2. Direkte Fusion unter Bildung von Hybrid-Organellen und Reformierung von Lysosomen
3. Vesikulärer Transport zwischen Endosomen und Lysosomen

Storrie und Desjardins (1996) bewiesen einen Stoffaustausch zwischen späten Endosomen und Lysosomen, der dadurch passiert, dass beide Vesikel wiederholt kurzzeitig miteinander fusionieren, um sich anschließend wieder zu trennen. Dieser Vorgang bezeichneten sie als „kiss und run“-Mechanismus (Abb. 2.1.). Mullock et al., 1998 beschrieben eine stabile Hybridorganelle (Abb. 2.2.), die durch direkte und komplette Fusion von späten Endosomen und Lysosomen entsteht (Griffiths, 1996, Mullock et al., 1998, Luzio et al., 2000). Diese Organellen weisen eine Dichte auf, die zwischen der von späten Endosomen und Lysosomen liegt (Mullock et al., 1998). Nach Fusion können sich die Lysosomen aus diesem Kompartiment neu formieren, indem sie entweder ausknospen (Griffiths, 1996) oder den Lumeninhalt konzentrieren, komprimieren und Membranproteine über Vesikeltransport ausschleusen (Bright et al., 1997, Luzio et al., 2000), so dass sie später erneut mit späten Endosomen fusionieren können. Neben dieser heterogenen Fusion von spätem Endosom und Lysosom wurden auch homogene Fusionen von Lysosomen (Storrie und Desjardins, 1996, Ward

et al., 1997) und späten Endosomen (Aniento et al., 1993) untereinander beobachtet (Piper et al., 2001). Thilo et al. (1996) postulierten einen Stoffaustausch durch Vesikeltransport zwischen späten Endosomen und Lysosomen (Abb. 2.3.)

Späte Endosomen und Lysosomen unterscheiden sich nicht nur in ihrem ultrastrukturellen Aufbau, ihrer Dichte, ihrem intravesikulären pH-Wert sondern auch in ihrer Ausstattung an hydrolytischen Enzymen (Schmid et al., 1988, Ludwig et al., 1991, Berg et al., 1995). Letztere differiert qualitativ und quantitativ. Die Lysosomen enthalten die höchste Konzentration an hydrolytischen Enzymen, wie Nukleasen, Phosphatasen, Proteasen (Serin-, Aspartat-, Cysteinproteasen), Lipasen, Sulfatasen und Glucosidasen. Claus et al. (1998) zeigte, dass die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin H in höchster Konzentration in den frühen Endosomen von J774 Makrophagen vorkommt, während es in den Lysosomen gerade noch nachweisbar ist. Demgegenüber befinden sich die Cathepsine B und L in den reifen Lysosomen, Cathepsin S dominiert in den späten Endosomen. Auch die Reifung von Cathepsin D erfolgt in den prälysosomalen Vesikeln (Delbrück et al., 1994).

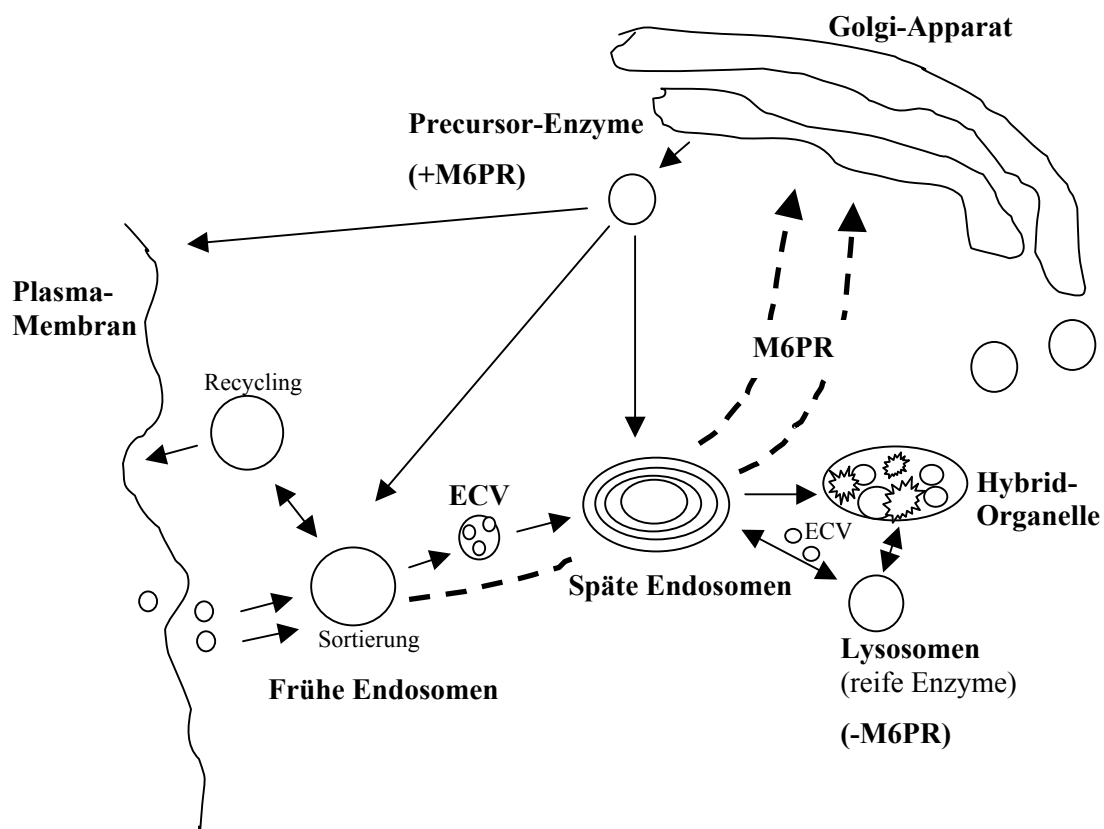
Aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Vergleich zu den frühen Endosomen besitzen die späten Endosomen und Lysosomen auch eine höhere proteolytische Aktivität, diese ist zum einen auf die unterschiedliche Enzymausstattung als auch auf die pH-abhängige Aktivierung der intravesikulären Zymogene (Proenzyme) zurückzuführen, so dass der Grad der Proteolyse von Substraten (partiell, total) in den verschiedenen endocytotischen Vesikeln/Kompartimenten differiert. Insulin oder andere Hormone (Backer et al., 1990, Doherty et al., 1990) werden z.B. vorzugsweise in den frühen Endosomen abgebaut. Es wird vermutet, dass weniger stabile Proteine prälysosomal, während proteolytisch resistendere Proteine in den proteolytisch hochaktiven Lysosomen verdaut werden (Tjelle et al., 1996).

Die Lysosomen galten über einen langen Zeitraum als Hauptkompartiment des intrazellulären Abbaues (Kornfeld und Mellmann, 1989). Nach neueren Erkenntnissen stellen jedoch die späten Endosomen und die Hybrid-Organellen die Hauptabbaukompartimente von Proteinen, Polysacchariden, Lipiden, DNA's, RNA's dar (Tjelle et al., 1996, Bright et al., 1997). Obwohl die späten Endosomen nur 20 % der Hydrolasengesamtkonzentration enthalten, sind sie aber hauptverantwortlich für die Abbauprozesse. Demgegenüber besitzen die Lysosomen zwar den Hauptanteil der hydrolytisch aktiven Enzyme (Storrie, 1988) jedoch macht ihr Anteil an den Proteolysevorgänge nur 20 % aus (Tjelle et al., 1996, Bright et al., 1997, Pillay et al., 2002). Nach Tjelle et al. (1996) und Griffiths (1996) fungieren die Lysosomen hauptsächlich als Speicherort für aktive Hydrolasen.

Die entstandenen Spaltprodukte können entweder die prälysosomale/lysosomale Membran passieren und als Baustoffe für den eigenen Zellstoffwechsel genutzt werden oder werden in Einschlusskörperchen in den Lysosomen eingelagert.

In Antigen-präsentierenden Zellen sind die späten Endosomen und Lysosomen auch an der Erfüllung spezifischer Funktionen, der Antigenpräsentation, beteiligt. In ihnen werden Spaltprodukte von Fremdproteinen erzeugt, die nach Bindung an MHC II-Komplexe durch Vesikeltransport zur Zelloberfläche transportiert werden (Berg et al., 1995, Hsieh et al., 2002, Pluger et al., 2002).

Abb. 3 stellt zusammenfassend die Komplexität der prälysosomalen und lysosomalen Ebenen bei dem Substratabbau dar.



**Abb. 3: Organisation des endosomalen/lysosomalen Kompartimentes: frühe Endosomen, späte Endosomen, Lysosomen als Hauptkompartimente, nach Pillay et al., 2002**  
 durchgezogene Linien zwischen den Organellen repräsentieren Vesikeltransport, Reifung bzw. direkte Fusion. Unterbrochene Linien stellen den Rücktransport von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren dar.  
 ECV-extracelluläre Vesikel

Die Membranen der späten Endosomen und der Lysosomen enthalten die Membranproteine LAMP 1 und 2, die stark glycosyliert sind (Griffiths et al. 1988). Sie bilden eine Glycokalix,

schützen die Membran vor dem Abbau durch hydrolytische Enzyme und verhindern damit das Übertreten von Hydrolasen in das Zytoplasma der Zellen. Es konnte an Mäusen, die kein LAMP1 und LAMP 2 exprimieren, gezeigt werden, dass das Fehlen dieser Glycoproteine nicht mit dem Leben vereinbar ist (Andrejewski et al., 1999). Darüber hinaus erfüllen diese Proteine wichtige Funktionen bei dem selektiven Import und Abbau von cytosolischen Proteinen (Cuervo und Dice, 1996, 1998, Eskelinen et al., 2002).

## **2.2. Synthese und Sortierung lysosomaler Enzyme**

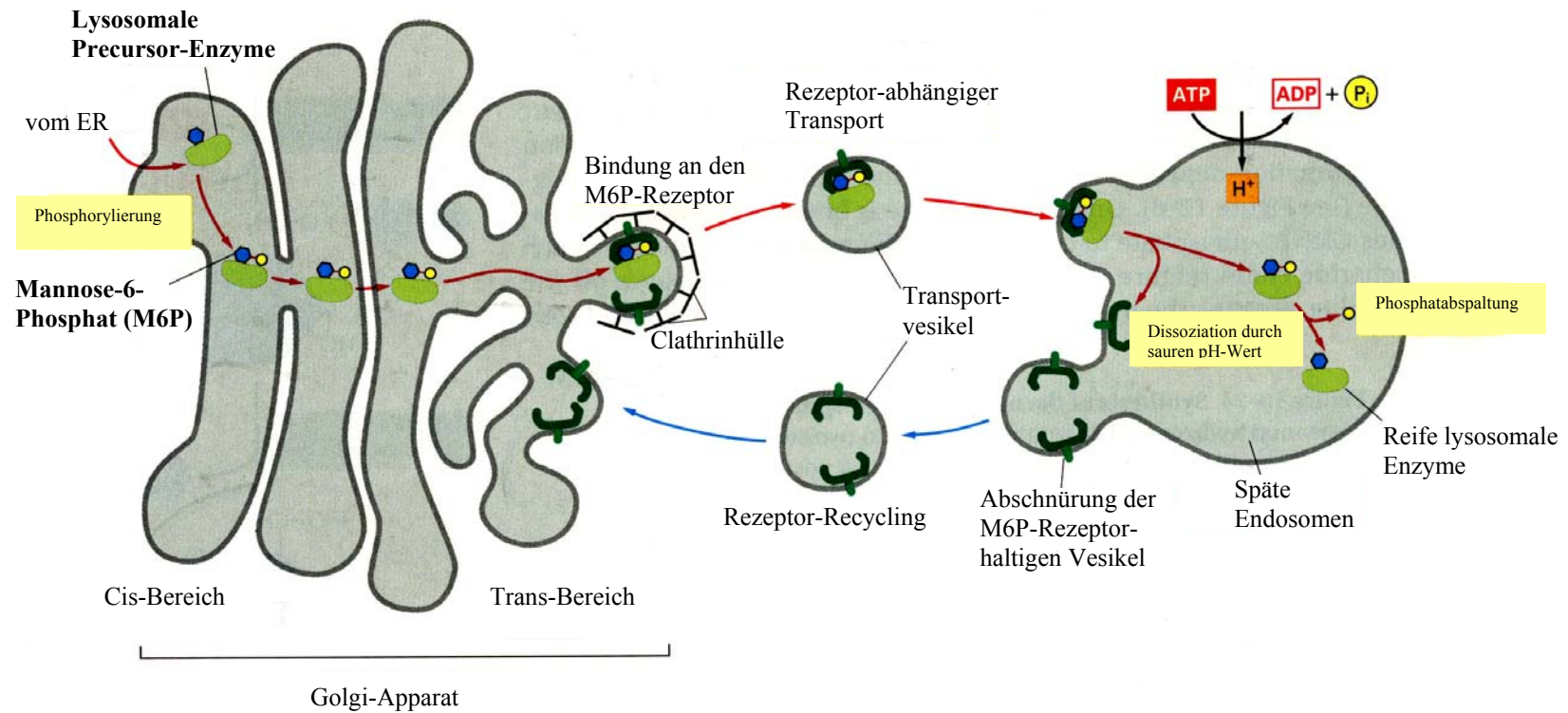
Heutzutage sind bis zu 50 verschiedene lysosomale Enzyme bekannt, den Hauptanteil bilden saure Hydrolasen (Pillay et al., 2002). Die lysosomalen Enzyme werden an den Ribosomen als katalytisch inaktive Vorstufen, die als Zymogene oder Proenzyme bezeichnet werden, synthetisiert. Die dem Proenzym am N-Terminus vorgelagerte Präsequenz von 15-20 Aminosäuren fungiert als Signalsequenz, die es ermöglicht, dass dieses Protein während der Synthese in das endoplasmatische Retikulum eingeschleust wird. Nach Eintransport des Präproenzymes wird die Signalsequenz (Präregion) abgespalten. Neben diesem Prozess werden die Precursorproteine cotranslational glycosyliert, indem verzweigte Oligosaccharidketten z.B. auf Asparaginreste übertragen werden. Die Lokalisation der N-glykosidischen Bindung wird durch die Erkennungssequenz Asparagin-x-Serin oder Asparagin-x-Threonin determiniert. Je nach Anzahl und Lokalisation dieser Glycosylierungssequenzen können Proteine mehrfach und sowohl in der Proregion des Precursors als auch im reifen Enzymanteil glycosyliert werden. Während des vesikulären Transportes vom endoplasmatischen Retikulum durch die verschiedenen Zisternen des Golgi-Apparates erfahren die Oligosaccharidketten vielfältige Modifikationen. Im Falle der lysosomalen Proteine erfolgt am Ende dieser Prozesse die Phosphorylierung endständiger Mannose-Reste der Zuckerkette in einer zweistufigen Reaktion, welche durch die UDP-N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase und Phosphodiesterase katalysiert wird. Die Mannose-6-Phosphatreste stellen das Sortierungssignal dar, durch welches die Proteine in das prälysosomale Kompartiment transportiert werden. Nach Verlassen der cis-Zisternen des Golgi-Apparates wird das für das prälysosomale/lysosomale Kompartiment bestimmte Protein im trans-Golgi-Sektor an einen membranständigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gebunden (Abb. 4). Es sind 2 verschiedene Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Typen bekannt: ein Kationen-unabhängiger (300 kDa) und ein Kationen-abhängiger (46 kDa) Rezeptor. Sie unterscheiden sich in ihrer molaren Masse, elektrischer Ladung und den Ligandbindungseigenschaften (Ludwig et al., 1994, Pohlmann et al., 1995) sowie in ihrer subzellulären Verteilung (Hille-

Rehfeld, 1995). Beide Rezeptortypen sind für den Transport unterschiedlicher lysosomaler Proteine aus dem trans-Golgi-Sektor in die Lysosomen essentiell (Köster et al., 1993, Kasper et al., 1996). Der Proteintransport erfolgt zu 70 % über den Kationen-unabhängigen und zu 30 % über den Kationen-abhängigen Rezeptor (Gabel et al., 1983, Stein et al., 1987a). Nach Abschnüren von Vesikeln gelangt der Protein-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Komplex in den endocytotischen Kreislauf des prälysosomalen/ lysosomalen Kompartimentes. Nach Fusion der Transportvesikel mit den frühen oder späten Endosomen (Ludwig et al., 1991) dissoziieren Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und die transportierten Proteine aufgrund des sauren prälysosomalen Milieus (von Figura und Hasilik, 1986). Die Rezeptoren können anschließend von den Endosomen aufgrund bestimmter Signalstrukturen durch Vesikeltransport zum Golgi-Apparat rezyklisieren (Abb. 4). Die Ausstattung der Lysosomen erfolgt über die in Abb. 2 demonstrierten Prozesse. Eine direkte Sortierung von Proteinen in die Lysosomen über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Weg ist ausgeschlossen, da die Lysosomen keine Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren enthalten (Sahagian und Neufeld, 1983, Stein et al., 1987).

In den Endosomen wird das katalytisch inaktive Proenzym durch limitierte Proteolyse zum reifen, katalytisch aktiven Enzym überführt, wobei die Proregion abgespalten wird. Die Prozessierung des Zymogens erfolgt unter anderem autokatalytisch durch eine Konformationsänderung, die durch die hohe intravesikuläre Protonenkonzentration der Endosomen ausgelöst wird. Für die Procathepsine L, B, K, S (Salminen und Gottesman, 1990, Brömme et al., 1993, Mach et al., 1993, Maubach et al., 1997, McQueney et al., 1997) wurde ein solcher autokatalytischer Aktivierungsmechanismus beschrieben.

Es ist jedoch auch wahrscheinlich, dass die Gegenwart einer Vielzahl aktiver Proteasen im Endosom die Prozessierung heterokatalytisch katalysiert. Dafür spricht die Beobachtung, dass sich die Halbwertszeit von reifem, katalytisch inaktivem Cathepsin S, bei dem das Cystein 29 des aktiven Zentrums mittels ortsgerichteter Mutagenese durch Alanin ausgetauscht worden war, nicht von der des katalytisch aktiven Wildtyp-Cathepsin S unterscheidet (Kreusch et al., 2000). Manche lysosomalen Enzyme sind in beide Prozessierungswege involviert, so wurde für Procathepsin D ein autokatalytischer Aktivierungsweg beschrieben, gleichzeitig ist die reife Form aber auch an der heterokatalytischen Prozessierung von Procathepsin L und B beteiligt (Nishimura et al., 1989, Mach et al., 1993).

Neben der oben beschriebenen klassischen Direktion synthetisierter lysosomaler Enzyme in die endocytotischen Kompartimente können auch sezernierte lysosomale Enzyme durch



**Abb. 4: Sortierung von lysosomalen Enzymen** nach Alberts et al., 1994 "Molecular biology of the cell"



Endocytose wiederaufgenommen werden. Eine geringe Menge an neu synthetisierten lysosomalen Enzymen wird in das extracelluläre Medium sezerniert (Jadot et al., 1997), so konnten unter anderem lysosomale Proenzyme in Kulturmedien von Makrophagen (Nissler et al., 1998) und Tumorzellen, z.B. Mamma-Ca-Zellen (Rijnboutt et al., 1991) nachgewiesen werden. Die sezernierten lysosomalen Enzyme werden zum Teil über rezeptorvermittelte Endocytose reinternalisiert, der Mannose-6-Phosphat-Rest der Oligosaccharidkette fungiert erneut als Erkennungssignal. 10 % der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren der Zellen sind in die Plasmamembran integriert (Geuze et al., 1988, Hille-Rehfeld, 1995). Die Bindung der sezernierten lysosomalen Proenzyme an der Außenseite der Plasmamembran erfolgt hauptsächlich an den Kationen-unabhängigen Rezeptor, obwohl beide Rezeptortypen in der Plasmamembran vorkommen. Der Kationen-abhängige Rezeptor wird zwar endocytiert, doch ist er nicht in der Lage, Liganden unter physiologischen Bedingungen an der Zelloberfläche zu binden (Stein et al., 1987a, 1987b, Ludwig et al., 1994, Hille-Rehfeld, 1995). Nach Endocytose gelangen die extrazellulären lysosomalen Proteine durch Vesikeltransport in die Endosomen. Als Beispiel sei die Endocytose von Procathepsin S angeführt (Nissler et al., 1998). Procathepsin S wird von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293-Zellen), die selbst kein Procathepsin S exprimieren, endocytiert und erreicht auf dem beschriebenen Weg das Endosom und Lysosom, so dass in diesen Zellen reifes Cathepsin S nachweisbar war. Die Endosomen bilden einen Kreuzungspunkt der biosynthetischen und der endocytotischen Sortierung lysosomaler Enzyme. Ab diesem Kompartiment können endocytierte, extracelluläre lysosomale Enzyme nicht mehr von zelleigenen lysosomalen Enzymen unterschieden werden. (Dahms et al., 1989).

### **2.3. Bedeutung lysosomaler Enzyme**

Die physiologische Bedeutung der Mehrzahl der lysosomalen Proteasen ist unbekannt, vielfach sind ihre physiologischen Substrate noch nicht identifiziert. In den letzten Jahren wurde jedoch die Funktion der Cathepsine der Papain-Familie bei dem allgemeinen Proteinabbau teilweise erkannt. Durch die Forschung an knock-out-Mäusen, bei denen die Expression einzelner und auch mehrerer lysosomaler Proteinasen verhindert wird, gelangen Einblicke in die spezifischen in vivo-Funktionen einzelner Cathepsine bei physiologischen und pathologischen Prozessen. Cathepsin B ist zum Beispiel für die vorzeitige Prozessierung und Aktivierung von Trypsinogen zu aktivem Trypsin verantwortlich. Auch Cathepsin L ist in der Lage Trypsinogen zu prozessieren, jedoch unter der Bildung inaktiver Spaltprodukte. Dieser Antagonismus von Cathepsin B und L hat eine Bedeutung bei der Entstehung der

akuten Pankreatitis (Figarella et al., 1988a, 1988b, Halangk et al., 2000). Darüber hinaus ist Cathepsin B, aber auch die Cathepsine D und L am Wachstum, Ausbruch, Vaskularisation und Metastasierung verschiedener Tumoren (Krüger et al., 1999) beteiligt. Neben dem allgemeinen Proteinabbau ist Cathepsin L an der Regeneration von Epidermis und Keratinozyten beteiligt (Roth et al., 2000, Reinheckel et al., 2001, Tobin et al., 2002). Cathepsin L-knock-out-Mäuse entwickelten zudem nach einem Jahr eine dilatative Kardiomyopathie, die sich in Form einer zunehmenden Herzhöhlenerweiterung, einer verminderten Auswurfleistung und einer interstitiellen Fibrose ausprägte (Stypman et al., 2002).

Die lysosomalen Cysteinproteasen Cathepsin S und Cathepsin L übernehmen zudem spezifische Funktionen bei der MHC II vermittelten Antigenpräsentation. Sie gehören zu den entscheidenden Proteasen, die die Prozessierung der invarianten Kette Ii des MHC II-Moleküles katalysieren (Riese et al., 1996, Villadangos et al., 1997, Riese et al., 1998, Driessen et al., 1999). Der oligomere MHC II-Ii-Komplex schützt während der Sortierung im ER, Golgi-Compartiment und während des vesikulären Transportes zur Zelloberfläche vor vorzeitiger, inadäquater Beladung mit nicht antigenen Peptiden. Cathepsin S wird v.a. von B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Demgegenüber findet man Cathepsin L nur in Makrophagen. Cathepsin S- bzw. Cathepsin L-knock-out-Mäuse zeigten eine schwer gestörte Antigenpräsentation in peripheren lymphatischen Geweben (Honey et al., 2001). Bei den Cathepsin S knock-out-Mäusen ist vor allem die MHC-II Präsentation gestört, während die T-Zell-Selektion unbeeinflusst ist. Im Gegensatz dazu ist bei den Cathepsin L-knock-out-Mäusen vorzugsweise die T-Zell-Selektion gestört (Nakagawa et al., 1998, Riese et al., 1998, Nakagawa et al. 1999a, 1999b, Shi et al., 1999). Kürzlich wurde beobachtet, dass die Cathepsin S und L nicht nur eine Funktion bei der Prozessierung der invarianten Kette Ii aufweisen, sondern auch an der direkten Herstellung antigener Peptide aus exogenen Antigenen beteiligt sind (Hsieh et al., 2002, Pluger et al., 2002).

Cathepsin K ist eine Cysteinproteinase, die vorwiegend in Osteoklasten exprimiert wird (Inaoka et al., 1995). Aufgrund dieser Verteilung wurde ihm, auch wegen seiner ausgeprägten elastinolytischen Aktivität eine bedeutende Rolle bei Knochenumbauprozessen zugesprochen. Kollagen und Osteonectin wurden als physiologischen Substrate des aktiven Cathepsin K identifiziert (Bossard et al., 1996). In Untersuchungen mit Cathepsin K knock-out-Mäusen konnte eine Veränderung des Knochenstoffwechsels nachgewiesen werden. Speziell war die resorptive Aktivität der Osteoklasten so stark gestört, dass sich eine Osteosklerose ausbildete (Saftig et al., 1998, 2000).

Bei einer autosomal rezessiv vererbaren Skeletterkrankung, der Pyknodysostosis, die durch eine Osteosklerose, Kleinwuchs und Acroosteolysen gekennzeichnet ist, wurde eine Mutation des Cathepsin K-Genes nachgewiesen. Die Knochen dieser Patienten können zwar demineralisiert, aber aufgrund des Cathepsin K-Mangels der Osteoklasten nicht abgebaut bzw. umgebaut werden (Gelb et al., 1996, Saftig et al., 1998, 2000, Motyckova et al., 2002). Hou et al. (2001) entdeckten, dass Cathepsin K nach Komplexierung mit Glucosaminoglykanen in der Lage ist, natives helicales Kollagen zu spalten, diese Spaltung ist eine wichtige Voraussetzung für den weiteren Abbau durch andere Cathepsine und Matrixmetalloproteasen. Neben dieser physiologischen Bedeutung ist Cathepsin K aber auch an der Entwicklung der Rheumatoiden Arthritis und der Osteoporose beteiligt, die durch ausgeprägte Osteoklasten- und Cathepsin K-Aktivitäten bedingt sind (Hou et al., 1999, 2001, 2002).

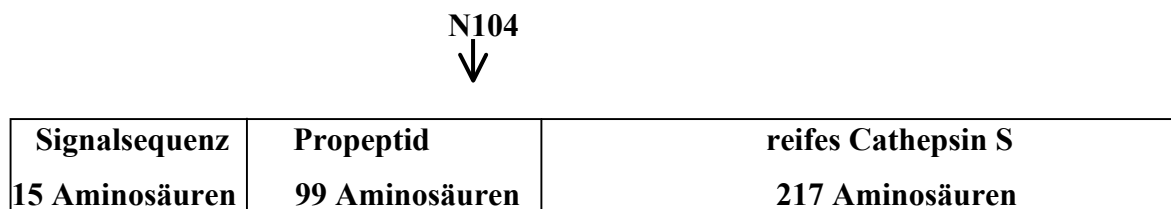
Weitere Erkrankungen, wie das Papillom-Lefevre-Syndrom und die Lipofuscinosis konnten auf eine fehlende Expression der Cathepsine C (Hart et al., 1999, Nakano et al., 2001) und D (Koike et al., 2000) zurückgeführt werden.

## **2.4. Aufbau und Funktion von Cathepsin S**

Cathepsin S (EC 3.4.22.27) und eine Reihe weiterer Cysteinproteasen werden zur Familie der Papain-ähnlichen Proteasen zusammengefasst. Das aktive Zentrum dieser Enzyme enthält die katalytische Diade Cystein<sup>25</sup> Histidin<sup>151</sup>, entsprechend der Nummerierung im Papain-Molekül und ist somit dem des Papains ähnlich. Diese Familie enthält eine Vielzahl von Proteasen mit unterschiedlichsten Aktivitätsspektren, so finden sich in dieser Gruppe Exopeptidasen, Endopeptidasen, Dipeptidylpeptidasen und Aminopeptidasen. Die Cathepsine der Papainfamilie werden zudem in 2 Subfamilien unterteilt: in Cathepsin L-ähnliche und in Cathepsin B-ähnliche Cysteinproteasen. Beide Subfamilien unterscheiden sich nicht wesentlich im Bereich des reifen Cathepsins, sondern in der Proregion. Die Cathepsin L-ähnlichen Enzyme enthalten zwei Sequenzabschnitte, die ERF(W)NIN- und die GNFD-Sequenz im Bereich der Proregion, welche die Cathepsin B-ähnlichen Cysteinproteasen in ihrer Struktur nicht besitzen (Karrer et al., 1993).

Cathepsin S ist eine Endoprotease der Cysteinprotease-Familie. Das Cathepsin S-Gen ist auf dem Chromosom 1q21 lokalisiert. Sie ist eine streng gewebspezifisch exprimierte Cysteinprotease, welche im Jahr 1975 erstmals beschrieben wurde (Turnsek et al., 1975). Wie für lysosomale Proteasen charakteristisch, wird es als inaktives Präproenzym mit einer Gesamtlänge von 331 AS synthetisiert (Wiederanders et al., 1991, 1992). Nach Abspaltung

der Signalsequenz von 15 AS resultiert das inaktive Procathepsin S von 316 AS und einer Molmasse von 37 kDa (vergl. Abb. 5). Nach Synthese und Eintransport in das endoplasmatische Retikulum wird Procathepsin S an der Glycosylierungsstelle N104 (Asn<sup>-11</sup> – Ile<sup>-10</sup> – Thr<sup>-9</sup>) im Propeptid glycosyliert. Im Gegensatz zu anderen Cysteinproteasen wie z.B. den Cathepsinen L, B und H besitzt Procathepsin S nur eine Oligosaccharidseitenkette. Nach weiteren Modifizierungen der Oligosaccharidseitenkette mit dem Ergebnis eines endständigen Mannose-6-Phosphat-Restes wird das noch inaktive Enzym durch die unter 2.2. beschriebenen Prozesse in die Endosomen und Lysosomen transportiert, wo es aufgrund des sauren Milieus durch Abspaltung des Propeptids (99 AS) in die reife katalytisch aktive Form (217 AS und MW 24 kDa) überführt wird.



**Abb. 5: Struktur von humanem Cathepsin S**

Durch Inkubation bei pH 4,5 kann Procathepsin S auch in vitro zum aktivem Enzym prozessiert werden (Wiederanders et al., 1992, Nissler et al., 1998).

Aufgrund einer hohen Ähnlichkeit mit dem Cathepsin L hinsichtlich Molekulargewicht, isoelektrischem Punkt, pH-Stabilität, Substratspezifität und Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren (Kirschke et al., 1984, Brömme et al., 1989) wird Cathepsin S zu den Cathepsin L-ähnlichen Proteasen gezählt. Zu dieser Gruppe von Cysteinproteasen gehören unter anderem auch die Cathepsine L, V, K, W, F, H (Turk et al., 2000). Es unterscheidet sich aber von den ubiquitär vorkommenden Cysteinproteasen Cathepsin B, H, L (Kirschke et al., 1998) und F (Nägler et al., 1999), die u.a. für den allgemeinen Proteinabbau im Lysosom verantwortlich sind, durch ein strenges gewebs- und zellspezifisches Expressionsmuster. So wurden hohe Konzentrationen von Cathepsin S in immunologisch aktiven Geweben, wie Milz, Lymphknoten und Ileum nachgewiesen. Hauptsächlich befindet sich die Protease in immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, Monozyten und antigenproduzierenden/präsentierenden Zellen (Kirschke et al., 1989, Shi et al., 1993).

Die Metastasierung von Tumoren ist durch eine erhöhte Expression proteolytischer, lysosomaler Enzyme gekennzeichnet: Zellen der nicht kleinzelligen Lungen-Carzinomzell-Linie 97 TM1 synthetisieren beträchtliche Mengen an Procathepsin S (Nissler et al., 1998).

Auch in Astrozytomen (Gibson et al., 2002) und in Prostata-Carcinomen (Fernandez et al., 2001) konnte eine erhöhte Konzentration von Cathepsin S nachgewiesen werden. Neben der Synthese von Procathepsin S sezernieren die 97 TM1-Zellen den Precursor auch in das Kulturmedium (Nissler et al., 1998). Das Aktivitätsspektrum der meisten lysosomalen Cysteinproteasen liegt im Bereich eines pH-Wertes von 4-5. Angesichts des um mehrere Größenordnungen höher liegenden pH-Wertes des Extrazellularraumes ist die Wirkung der Mehrzahl der Proteasen in diesem Kompartiment eingeschränkt. Eine Besonderheit des Cathepsin S im Vergleich zu den Cathepsinen B, H, K, L ist seine Stabilität und katalytische Aktivität in einem Bereich von pH 5.0 – 7.5 (Brömme et al., 1993). Durch diese Eigenschaft entwickelt Cathepsin S auch außerhalb der Lysosomen eine nennenswerte katalytische Aktivität, welche bei der Tumorausbreitung von Bedeutung sein kann.

Aufgrund seiner elastinolytischen Aktivität (Shi et al., 1992, Reddy et al., 1995) ist Cathepsin S auch bei entzündlichen Prozessen, wie z.B. an der Entstehung der rheumatoiden Arthritis (Hou et al., 2001, Nakagawa et al., 1999b) und der Emphysemausbildung (Wolters und Chapmann, 2000), beteiligt. Bei der Entstehung der Arteriosklerose kommt dem Cathepsin S eventuell ebenfalls eine Bedeutung zu (Shi et al, 2003, Sukhova et al., 2003).

## **2.5. Alternative Sortierung von lysosomalen Enzymen**

Die Bedeutung des Mannose-6-Phosphat-Restes als Sortierungssignal für lysosomale Proteine wird an einer lysosomalen Speicherkrankheit, der Mucopolidose II, deutlich. Sie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die erstmals 1967 von Leroy und DeMars beschrieben wurde. Patienten, die an dieser Erkrankung leiden, wiesen unter anderem schwere psychomotorische Retardierungen, Skelettdeformierungen, Bindegewebsschwäche und eine reduzierte Gesamtmuskelmasse einschließlich des Herzmuskelgewebes auf.

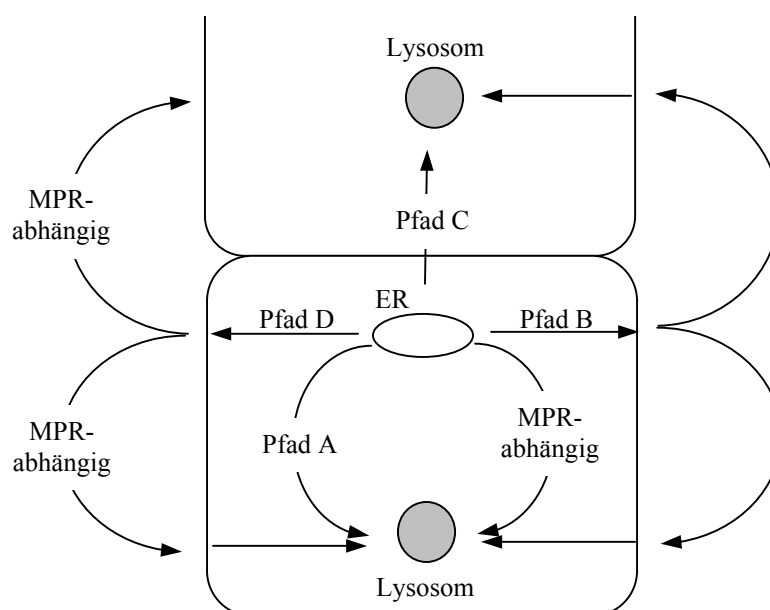
Ursache für diese Erkrankung ist ein genetischer Defekt, der dazu führt, dass die UDP-N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase nicht exprimiert wird. Demzufolge werden die Mannosereste lysosomaler Proteasen im endoplasmatischen Retikulum nicht phosphoryliert (Varki et al., 1981) und können nicht an die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren binden. Deshalb werden sie sezerniert und in großen Mengen in den Körperflüssigkeiten der Patienten (Blutplasma, Liquor cerebrospinalis, Tränen, Urin) nachweisbar.

Aufgrund der fehlenden lysosomalen Enzyme sind die Lysosomen mikroskopisch deutlich vergrößert und aufgebläht. In ihnen reichern sich große Mengen an abzubauenem Material an, die mikroskopisch als „inclusion-bodies“ sichtbar werden. Die gestörte katabole Funktion der Lysosomen ist vor allem in Fibroblasten ausgeprägt, wodurch auch die Prädisposition der

Erkrankung auf den Skelett-, Bindegewebs- und Muskelapparat erklärt werden kann. Bei den Patienten liegt jedoch keine totale Blockierung des Proteintransportes in die Lysosomen vor. In bestimmten Geweben wie Leber, Niere, Milz und Gehirn wurden lysosomale Proteine in normaler bis erhöhter Konzentration in den Lysosomen nachgewiesen, obwohl ihnen das Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignal fehlt. Das führte zu der Vermutung, dass neben dem Mannose-6-Phosphat-Weg alternative Sortierungssignale und -wege für die Adressierung von Proteinen in die Lysosomen existieren (Tsuji et al., 1988, Waheed et al., 1988, Glickman und Kornfeld, 1993).

In den vergangenen Jahren wurden u.a. von Dittmer et al. (1999) alternative Transportwege für lysosomale Enzyme in die Lysosomen postuliert (Abb. 6). Mit Experimenten an knock-out-Mäusen, die keine Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren exprimieren und dadurch dem klinischen Phänotyp der I-Cell-Erkrankung entsprechen, konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten und Thymocyten dieser Mäuse in der Lage sind, auf unterschiedlichen Wegen Cathepsin D Mannose-6-Phosphat-unabhängig in die Lysosomen zu transportieren (Dittmer et al., 1999).

In Hepatocyten wurde Procathepsin D zu 90 % in das Medium sezerniert und über den endocytotischen Sortierungsweg in die Lysosomen eintransportiert, wo es zum reifen katalytisch



**Abb. 6: Mannose-6-Phosphat-abhängige und alternative Transportwege für die Sortierung lysosomaler Enzyme in das endosomale/lysosomale Kompartiment (nach Dittmer et al., 1999)**

Pfad A: Mannose-6-Phosphat-unabhängige intrazelluläre Sortierung

Pfad B: extrazelluläre Sekretion und Endocytose

Pfad C: Transfer über direkten Zell-Zell-Kontakt

Pfad D: extrazelluläre Sekretion und Mannose-6-Phosphat-abhängige Endocytose

MPR-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor

aktiven Cathepsin D prozessiert wurde (Abb. 6. Pfad B). Demgegenüber wurde Cathepsin D in Thymocyten dieser knock-out-Mäuse direkt über einen unbekannten Weg in das endosomale/lysosomale Kompartiment sortiert (Abb. 6 Pfad A). Eine weitere Alternative stellt der Transfer lysosomaler Enzyme über direkten Zell-Zell-Kontakt dar, wofür der Transport der neu synthetisierten Enzyme zur Zelloberfläche eine Voraussetzung ist (Abb. 6 Pfad C) (Olsen et al., 1981, 1983, Abraham et al., 1985, Dean und Martin, 1988, Dittmer et al., 1999).

Nissler et al. (1998) postulierten auch für Procathepsin S ein alternatives Sortierungsmotiv. Zur Untersuchung eines zum Mannose-6-Phosphat-Sortierungsweg alternativen Mechanismus wurde das in der Proregion des Procathepsin S lokalisierte Asparagin N 104 mit ortsgerichteter Mutagenese durch Glutamin ersetzt. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293-Zellen), die kein Procathepsin S endogen exprimieren, wurden mit der mutierten cDNA transfiziert und exprimierten nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q (Nissler et al., 1998). Das nicht glycosylierte Procathepsin S-N104Q gelangt aufgrund des fehlenden Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignales nicht in die Lysosomen und reift nicht, sondern akkumuliert als Proenzym in der Zelle und wird in großen Mengen ins Kulturmedium sezerniert. Nissler et al. wiesen nach, dass geringe Mengen an Procathepsin S-N104Q wieder aufgenommen werden und auf dem endocytotischen Weg die Lysosomen erreichen. Daraus ergibt sich die Frage nach einem alternativen Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungssignal für Procathepsin S.

Der Nachweis der Bindung von Procathepsin S an naive, intakte HEK 293-Zellen bei 2°C und 15°C weist daraufhin, dass die Bindung des Precursors an die Plasmamembran nicht unspezifischer Natur ist. Durch subzelluläre Fraktionierung wurde die überwiegende Menge an nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q in der Membranfraktion nachgewiesen (Nissler et al. 1998).

## 2.6. Zielstellung der Arbeit

Die Experimente dienen der Aufklärung der Sortierung von Procathepsin S in die Lysosomen. Grundlage der Arbeit sind vorausgegangene Untersuchungen, die Hinweise auf eine Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierung von Procathepsin S ergaben.

Untersuchungsobjekte sind HEK 293-Zellen, die endogen kein Procathepsin S synthetisieren sowie Transfektanten dieser Zellen, die Procathepsin S-Wildtyp bzw. nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren.

Folgende Untersuchungen wurden zum Nachweis eines alternativen Sortierungsweges für Procathepsin S durchgeführt:

1. Charakterisierung der Endocytose von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q bzw. Wildtyp-Procathepsin S durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur, der Zeit und der Konzentration des Precursors.
2. Nachweis der Kompetition von [<sup>35</sup>S]markiertem Procathepsin S-N104Q und nicht markiertem Procathepsin S-N104Q um die Bindung und Endocytose durch HEK 293-Zellen.
3. Lokalisierung des putativen Bindungsmotives im Procathepsin S-Molekül durch Endocytoseexperimente: reifes Cathepsin S versus Procathepsin S.
4. Lokalisation und intrazelluläre Verteilung von Procathepsin S-Wildtyp und Procathepsin S-N104Q in HEK 293-Zelltransfektanten mit ultrastrukturellen Untersuchungen. Immunoblot-Analyse von Lysosomenextrakten und lysosomalen Membranpräparationen zur Identifikation der Cathepsin S-Formen.
5. Versuche zur Darstellung eines Plasmamembranbindungsmotives für nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q unter der Verwendung eines Crosslinkers (DTSSP).



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Chemikalien

Acrylamid 30	SERVA BOEHRINGER, Ingelheim
Adenosintriphosphat (ATP)	SERVA BOEHRINGER, Ingelheim
Ammoniumperoxodisulfat 10%	ROTH GmbH, Karlsruhe
Anti-Cathepsin S-Antikörper vom Kaninchen ("Sascha")	Dr. Weber, Halle
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen
Dithiothreitol	SIGMA, Deisenhofen
Dinatriumdihydrogenethylendiamin-tetraacetat-2-hydrat (EDTA)	ROTH GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	SEROMED BIOCHROM KG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	FERAK, Berlin
3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidyl-propionat] (DTSSP)	PIERCE BIOTECH., Rockford USA
Ethanol	ROTH GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	MERCK, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA LABORATORIES, Cölbe
Glycin	ROTH GmbH, Karlsruhe
Gentamycin	SEROMED BIOCHROM KG, Berlin
Imidazol	MERCK, Darmstadt
Jodacetamid	SIGMA, Deisenhofen
Kaliumchlorid	ROTH GmbH, Karlsruhe
Kaninchenserum	SIGMA, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	ROTH GmbH, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	FERAK, Berlin
[ <sup>35</sup> S]Methionin	HARTMANN ANALYTIK, Braunschw.
Minimum Essential Medium (MEM), Minus-Medium für radioaktive Einbaustudien und Supplemente	SEROMED BIOCHROM KG, Berlin
Monochloressigsäure	MERCK, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ROTH GmbH, Karlsruhe
NADH	BOEHRINGER, Mannheim
p-Nitrophenyl -N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid	SIGMA, Deisenhofen
Percoll	PHARMACIA, Uppsala (Schweden)
Protein-A-Sepharose CL-4B	SIGMA, Deisenhofen

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SERVA BOEHRINGER, Ingelheim
Strata Clean Resin	STRATAGENE, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	ROTH GmbH, Karlsruhe
Saccharose	ROTH GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	FERAK, Berlin
Triton X-100	FERAK, Berlin
Trichloressigsäure	MERCK, Darmstadt
TRIS/HCl	ROTH GmbH, Karlsruhe
Trypsin	BIOCHROM, Berlin
Natriumtetrazoliumsalz	ROTH GmbH, Karlsruhe
Phenollösung	ROTH GmbH, Karlsruhe

### 3.2. Puffer

#### 3.2.1. Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung (PBS)

8,00 g NaCl	137,00 mM
+ 0,20 g KCl	2,70 mM
+ 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	10,13 mM
+ 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76 mM

Bei 25°C erfolgte die Einstellung auf pH 7,2. Anschließend wurde auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt und autoklaviert.

#### 3.2.2. Puffer A

3,58 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	10 mM
+ 1,56 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
Mischen beider Lösungen zur Einstellung auf pH 7,0	
+ 8,77 g NaCl	150 mM
+ 0,2 g Natriumazid	0,2 %

Anschließend wurde auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt.

#### 3.2.3. Imidazol-Saccharose-Puffer

0,68 g Imidazol	10 mM
+ 85,58 g Saccharose	250 mM

Bei 25°C erfolgte die Einstellung auf pH 7,2. Anschließend wurde auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt.

### 3.2.4. Homogenisierungspuffer

2,72 g Imidazol 40 mM  
+ 5,84 g NaCl 100 mM  
Lösen, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt  
+ 20 ml EDTA-Lösung, 100 mM 2 mM  
+ 50 ml Triton X100-Lösung (10%) 0,5 %  
Anschließend wurde auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt.  
Unmittelbar vor Einsatz des Puffers wurden je ml  
+ 10 µl PMSF-Lösung, 0,2 M in DMSO 2 mM  
+ 10 µl Jodacetamid-Lösung (0,5 M) 5 mM  
zuge setzt.

### 3.2.5. SDS-Elektrophorese-Probenpuffer (5fach) (Laemmli, 1970):

1,50 ml TRIS/HCl, 1 M, pH 6,8  
+ 2,50 ml SDS, 20 %  
+ 1,00 ml Glycerol  
+ 0,55 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
+ 5,00 µl Bromphenolblau, 0,7%

### 3.2.6. SDS-Elektrophorese-Puffer:

15 g TRIS  
+ 72 g Glycin  
+ 5 g SDS

Bei 25°C auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Vor Verwendung wurde die Lösung 1 : 5 mit Aqua dest, 2°C, verdünnt.

## 3.3. Zell-Linien und Zellkultivierung

### 3.3.1. Zell-Linien

1. HEK 293-Zellen: permanente Zell-Linie transformierter primärer humaner embryonaler Nierenzellen (ATCC CRL-1573), die selbst kein Cathepsin S enthalten (Munger et. al., 1995, Nissler et. al., 1998)
2. HEK 293-Zellen, transfiziert mit dem pcDNA3-Vektor, der die cDNA enthielt, die menschliches Cathepsin S codiert (pcDNA3hCS), Expression von glykosyliertem Procathepsin S (Wildtyp)

3. HEK 293-Zellen, transfiziert mit dem pcDNA3-Vektor, der die cDNA enthielt, die menschliches Cathepsin S codiert, dessen Asparagin 104, der einzigen Glykosylierungsstelle durch ortsgerichtete Mutagenese durch Glutamin ausgetauscht wurden war. (pcDNA3hCsN104Q); Expression von nicht glykosyliertem Procathepsin S (Procathepsin SN104Q) (Nissler et. al., 1998)

### **3.3.2. Kultivierung und Passagierung**

Als Kultivierungsmedium für die HEK 293-Zell-Linien diente Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), dem 10 % FKS, Gentamycin (50 µl/ml) und Geneticin G418 (600 µg/ml) zugesetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte in 50 ml, 75 ml bzw. 150 ml Kulturflaschen (GREINER) bei 37°C in einem 7,5 % CO<sub>2</sub>-Inkubator (HERAEUS INSTRUMENTS). Die Zellen wurden alle 3 Tage durch Trypsinisierung gewonnen und im Verhältnis 1 : 5 ausgesät. Es wurden nur adhärente Zellen für die Experimente benutzt.

### **3.4. Herstellung und Markierung von Procathepsin S, Procathepsin S-N104Q und Cathepsin S**

Die Experimente zur Untersuchung eines Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungsmotives für Procathepsin S erforderten eine empfindliche Nachweismethode, um möglichst auch geringste Spuren, z.B. von Prozessierungsprodukten erfassen zu können. Für die Untersuchungen wurde [<sup>35</sup>S]markiertes oder biotinyliertes Procathepsin S / Cathepsin S hergestellt.

#### **3.4.1. Radioaktive Markierung mit [<sup>35</sup>S]Methionin**

Die radioaktive Markierung von Procathepsin S erfolgte mit [<sup>35</sup>S]Methionin. Aufgrund der Methioninverteilung innerhalb der Aminosäuresequenz des Procathepsin S-Moleküles werden 7 Methionine im Propeptidanteil und 3 Methionine des reifen Cathepsin S markiert. Für die Vitalmarkierung der HEK 293-Zellen wurde synthetisches Minus-Medium für radioaktive Einbaustudien (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) der Firma GIBCO folgender Zusammensetzung verwendet.

Komponenten	mg/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	264,00
Fe(NO <sub>3</sub> ) x 9 H <sub>2</sub> O	0,10
KCl	400,00
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	200,00

NaCl	6400,00
NaHCO <sub>3</sub>	3700,00
Phenolrot	15,00
Glycin	30,00
L-Histidin HCl x H <sub>2</sub> O	42,00
L-Isoleucin	105,00
L-Lysin HCl	146,00
L-Phenylalanin	66,00
L-Serin	42,00
L-Threonin	95,00
L-Tryptophan	16,00
L-Tyrosin	72,00
L-Valin	94,00
Vitamine:	
D-Ca-Pantothenat	4,00
Cholinchlorid	4,00
Folsäure	4,00
Nikotinamid	4,00
Pyridoxal HCl	4,00
Riboflavin	0,40
Thiamin HCl	4,00

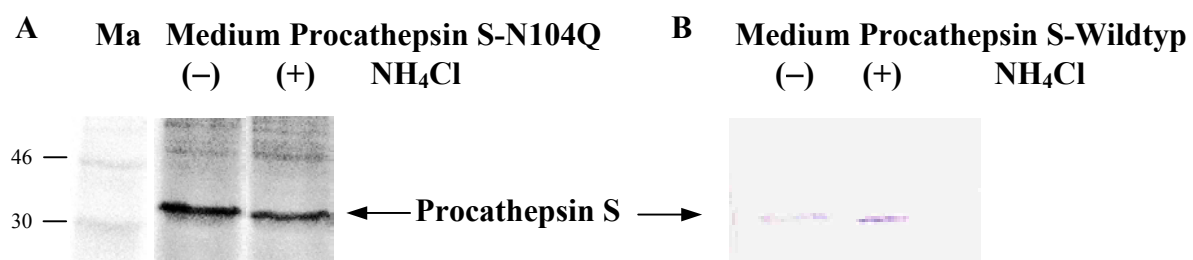
Zu diesem Medium wurden unter Sterilbedingungen die fehlenden Aminosäuren, mit Ausnahme des Methionin, zugesetzt (1 ml 100fach konzentrierte Supplementlösung/100 ml Minus-Medium):

Supplemente:	g/l
L-Arginin x HCl	8,4
Di-Natriumcystin	5,632
D-Glukose	450,00
L-Glutamin	58,40
i-Inositol	0,72
L-Leucin	10,50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	12,50

HEK 293-Zellen (50-75 ml Kulturflaschen, subkonfluent,  $1 \times 10^6$  Zellen je 50 ml Kulturflasche), die Procathepsin S-Wildtyp bzw. nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren und dieses in das Kulturmedium sezernieren, wurden unmittelbar vor der Markierung mit [ $^{35}\text{S}$ ]Methionin mit 5 ml methioninfreiem DMEM (ohne FKS) gewaschen und im Anschluss mit 5-10 ml methioninfreiem DMEM (-FKS) für 60 min bei 37°C und 7,5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Für die Vitalmarkierung und Herstellung von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S bzw. [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q wurde das methioninfreie Medium abgesaugt und durch 5–10 ml methioninfreies DMEM ersetzt, dem 10-20 MBq [ $^{35}\text{S}$ ]Methionin zugesetzt worden waren. Der Einbau der Aminosäure in die Zellen und in deren Syntheseprodukte erfolgte über einen weiten Bereich der zugesetzten Menge linear (Kessler, 1981). Nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 20-24h bei 37°C, 7,5 %  $\text{CO}_2$  wurde das Medium gewonnen und analysiert (3.7, 3.8.1). Die markierten Zellen wurden zum Teil für Bindungsexperimente wie unter Abschnitt 3.9. beschrieben verwendet.

Es wurde versucht die Ausbeute des sezernierten Procathepsin S-N104Q-Mediums durch Ammoniumchlorid zu erhöhen. Abb. 7 zeigt den Einfluss von Ammoniumchlorid, welches in einer Endkonzentration von 20 mM dem Markierungsmedium zugesetzt worden war, auf die Sekretion von Procathepsin S-N104Q (Abb. 7 A) und Procathepsin S-Wildtyp (Abb. 7 B) bei einer Inkubation der Zellen von 22h bei 37°C, 7,5 %  $\text{CO}_2$ .



**Abb. 7: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die Sekretion von Procathepsin S-N104Q und Procathepsin S-Wildtyp durch die entsprechenden HEK 293-Transfektanten**

**A:** Autoradiogramm der SDS-PAGE von je 25µl Kulturmedium von HEK 293-Zellen, die nicht glycosyliertes [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q exprimieren

**B:** Westernblot von 25µl konzentriertem (1:25) Kulturmedium von HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-Wildtyp exprimieren  
Kultivierung mit (+) und ohne (-) 20mM NH<sub>4</sub>Cl

Ammoniumchlorid erhöht die Ausbeute an [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q im Medium nicht, so dass auf seinen Einsatz verzichtet wurde.

### **3.4.2. Markierung durch Biotinylierung**

Die Biotinylierung von Cathepsin S-Formen erfolgte mit dem Biotinylierungskit: ECL protein biotinylation module RPN 2202, RPN 2203 der Firma AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH.

#### **3.4.2.1 Biotinylierung von Procathepsin S-Wildtyp und Procathepsin S-N104Q**

Als Ausgangspräparat dienten Kulturmedien von HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-Wildtyp bzw. mutiertes Procathepsin S-N104Q exprimieren und in das Kulturmedium sezernieren. 30 ml des Procathepsin S-haltigen Mediums wurden mit Hilfe einer Amicon-Druckfiltrationszelle auf 2,5 ml konzentriert. Anschließend wurde das Präparat mit dem Biotinylierungspuffer des ECL-protein-biotinylation-kites (AMERSHAM) verdünnt (Bicarbonatpuffer, 40 mM, pH 8,6), dem zur Vermeidung von Autolyse E64 in einer Endkonzentration von 2  $\mu$ M zugesetzt worden war.

Danach wurde erneut konzentriert. Zur Vervollständigung wurde die Konzentrierungs-/Verdünnungs-Prozedur dreimal wiederholt. 2,2 ml umgepufferte Procathepsin S-Lösung wurden mit 50  $\mu$ l Biotinylierungs-Reagenz des Kits versetzt. Zur Abtrennung von nicht umgesetztem Biotinylierungs-Reagenz wurde das Präparat auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 26/60 Superdex G75) aufgetragen, die zuvor mit PBS äquilibriert worden war und gereinigt. Elution der Proteine mit PBS, Flussgeschwindigkeit 3 ml/min und Fraktionierung je min. Der Nachweis des biotinylierten Proteins erfolgte durch SDS-PAGE, Westernblotting, Entwicklung des Westernblots durch Zusatz von Streptavidin-Peroxidase-Konjugat und Visualisierung der biotinylierten Proteine durch das ECL-System (Kapitel 3.8.3.2, 3.8.3.3.).

#### **3.4.2.2. Biotinylierung von reifem Cathepsin S**

Reifes Cathepsin S wurde von Dr. Ingrid Wenz, Institut für Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, durch in vitro-Prozessierung von gereinigtem Procathepsin S hergestellt, welches mit dem Baculovirus-System exprimiert wurde. Das Cathepsin S-Präparat war in TRIS-Puffer gelöst. Da die TRIS-Puffer-Base die Biotinylierungsreaktion stört, wurde das Präparat auf Bicarbonat-Puffer vor der Biotinylierung umgepuffert. 0,2 ml TRIS-haltige Cathepsin S-Lösung (4,7 $\mu$ g titriertes Cathepsin S/ml) wurden mit 2,0 ml Biotinylierungspuffer, 2  $\mu$ M E64 versetzt. Anschließend wurde mit der unter 3.4.2.1. beschriebenen Verdünnungs-/Konzentrierungs-Prozedur umgepuffert. Zur Biotinylierung wurden 2,2 ml umgepufferte Cathepsin S-Lösung mit 50  $\mu$ l Biotinylierungs-Reagenz 1h bei Raumtemperatur (21°C) inkubiert. Zur Abtrennung von nicht umgesetztem Biotinylierungs-Reagenz wurde das Präparat mit der mitgelieferten Gelfiltrationssäule Sephadex G25 gereinigt. Die Elution des

Enzymes erfolgt mit PBS (pH 7,5). Fraktionierung des Eluates je 1 ml. Der Nachweis des biotinylierten Proteins erfolgte durch SDS-PAGE, Westernblotting und die Entwicklung mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugates. Die Visualisierung erfolgte durch ECL-Auswertung (siehe 3.8.3.2.)

### **3.5. Gewinnung der Medien und Zellextrakte nach Endocytoseexperimenten**

**Medium:** Am Ende der Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Medium, wurden die Medien gewonnen und zur Entfernung möglicher abgelöster Zellen 3 min bei 800g bei 2°C (Kühlzentrifuge Mikro 22R HETTICH) zentrifugiert. Um nachfolgende proteolytische Veränderung weitestgehend zu vermeiden, wurde je ml Überstand 10 µl einer 0,2 M PMSF Lösung in DMSO (Endkonzentration 2 mM) bzw. 10 µl 0,5 M Jodacetamid (Endkonzentration 5 mM) oder 20 µl 0,1 mM E64 zugesetzt. Anschließend wurde das Medium für spätere analytische Untersuchungen eingefroren. Die Medien wurden bei -25°C aufbewahrt.

**Zellextrakt:** Die Zellen wurden 3x mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden die haftenden Zellen mit 1 ml PBS überschichtet und mit einem Zellschaber abgeschabt, suspendiert und in einem EPPENDORF-Becher überführt. Die Zellsuspension wurde 3 min bei 800g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml PBS suspendiert. Nach Resuspension der Zellen mit 1 ml PBS wurde nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment sofort in einem auf -20°C vorgekühlten Aluminiumblock tiefgefroren. Zum Aufschluss der Zellen wurde das tiefgefrorene Sediment mit 1.0 ml Homogenisierungspuffer versetzt und mit einem Vortex-Mixer homogenisiert. Zusätzlich erfolgte anschließend eine Ultraschallbehandlung mit dem Beschallungsbecher BB5 des Sonopuls-Ultraschall-Homogenisators (BANDELIN ELECTRONIC, Berlin) in eisgekühltem Aqua dest. 20 s bei 20 kHz und Maximalleistung (200 W) des Gerätes. Die Homogenate wurden danach 15 min bei 24000g bei 2°C zentrifugiert (Kühlzentrifuge Mikro 22R HETTICH) und die Überstände gewonnen. Dieser Überstand wird als Zellextrakt bezeichnet.

### **3.6. Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation des humanen Cathepsin S erfolgte aus den Kulturmedien und den Zellextrakten mit einem polyklonalen Antiserum, das durch Immunisierung von Kaninchen mit rekombinantem Cathepsin S gewonnen wurde (Dr. Weber, Universität Halle). Dieser Antikörper erkennt sowohl Procathepsin S, Procathepsin S-N104Q, reifes Cathepsin S und das Cathepsin S-Propeptid.



Immunpräzipitiert wurden Kulturmedien der Transfektanten bzw. Extrakte von Zellen, die bei den Endocytoseexperimenten mit diesen Kulturmedien, die markiertes Procathepsin S enthielten, inkubiert wurden. Der Gehalt an radioaktiv-markierten Fremdproteinen in den Medien ist sehr niedrig, demzufolge ist auch in den Zellextrakten die Anzahl markierter Fremdproteine im Vergleich zu der vitalmarkierter Zellen gering. Aus diesem Grund konnte auf eine Präabsorption vor der Immunpräzipitation verzichtet werden.

Den Medien bzw. Zellextrakten wurden je 5-10 µl Anti-Cathepsin S-Kaninchen IgG-Lösung zugesetzt und 15h unter ständiger Durchmischung auf einem Drehrad bei 2°C inkubiert. Zur Bindung der Immunkomplexe wurde 25 µl Protein-A-Sepharose zugesetzt und 2 h bei 2°C inkubiert (Drehrad). Nach Abzentrifugieren (1 min 24000g) wurden nicht gebundene markierte Proteine durch sechsmaliges Waschen des Protein-A-Sepharosesedimentes abgetrennt. Dieser Waschvorgang schloss einen Tube-Transfer ein.

Der Protein-A-Sepharose-Cathepsin-Anti-Cathepsin S-Komplex wurde durch Zusatz von 15 µl SDS-Elektrophorese-Probenpuffer (5fach) denaturiert. Die Ansätze wurden nach sorgfältiger Mischung auf einem Vortex-Mixer 5 min bei 100°C im Metallblock erhitzt. Nach Zentrifugation (1 min bei 24000g) wurde der Überstand auf das Polyacrylamidgel aufgetragen (vergl. 3.7.).

### **3.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (MINIPROTEAN-System von BIORAD).

Herstellung der Elektrophoresegele:

Größe 7 x 10 cm, Schichtdicke 0,75 mm, 10 Probenschlitze/Gel

Trenngel: (15 %)

2.3 ml Aqua dest.  
+ 5,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8 %)  
+ 2,5 ml TRIS/HCl-Puffer, 1,5 M, pH 8,8  
+ 0,1 ml SDS-Lösung (10 %)  
+ 0,1 ml Ammoniumpersulfat (10 %)  
+ 5,0 µl TEMED

Sammelgel: (4,5 %)

6.1 ml Aqua dest.  
+ 1,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8 %)  
+ 2,5 ml TRIS/HCl-Puffer, 1,5 M, pH 6,8  
+ 0,1 ml SDS-Lösung (10 %)  
+ 0,1 ml Ammoniumpersulfat (10 %)  
+ 5,0 µl TEMED

Probenvorbereitung:

20 µl Probe wurden mit 5 µl SDS-Elektrophorese-Probenpuffer (5fach) versetzt, mit einem Vortex-Mixer gemischt und 5 min bei 100°C erhitzt.

Große Probenvolumina, z.B. Filtrate von Druckfiltrationen oder Chromatographie-Eluate von 30 – 500 µl wurden mit 5 µl Strata Clean Resin (STRATAGENE) versetzt, gemischt und zentrifugiert (24000g, 2 min). Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit 15 µl SDS-Elektrophorese-Probenpuffer (5fach) versetzt, gemischt und 5 min bei 100°C erhitzt. Das Gemisch wurde aufgetragen.

Probenvorbereitung der Immunpräzipitate vergl. 3.6.

Molekulargewichtsstandards:

Als Molekulargewichtsstandards diente ein Gemisch von 6 gefärbten Eichproteinen (BIORAD) oder [<sup>14</sup>C]methylierten Eichproteinen (AMERSHAM, NEN)

kDa	BIORAD	kDa	AMERSHAM,	kDa	NEN
113	Phosphorylase b	220	Myosin	97,4	Phosphorylase b
91	Rinderserumalbumin	97,4	Phosphorylase b	69	Rinderserumalbumin
47,5	Eialbumin	66	Rinderserumalbumin	55,4	γ-Globulin SU1
33,9	Carboanhydrase	46	Eialbumin	46	Eialbumin
28,8	Trypsininhibitor	30	Carboanhydrase	30	γ-Globulin SU2
20,5	Lysozym	14,3	Lysozym	12,3	Cytochrom C
Einsatz von 5 µl Standard-Gemisch, unbehandelt		Einsatz von 5 µl Standard-Gemisch, + 10 µl SDS-Elektrophoreseprobenpuffer, 5 min 100°C			

Die zur Elektrophorese vorbereiteten Proben wurden *in toto* auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 150 mA unter Kühlung im Eisbad durchgeführt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 1 h.

### 3.8. Auswertung der Elektropherogramme der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

#### 3.8.1. Autoradiographie

Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung wurden die radioaktiv markierten Gele für 45 min unter Vakuum bei 80°C (Gel Dryer Model 583 BIORAD) getrocknet.

Die getrockneten Elektropherogramme wurden im High Sensitive Imaging Screen (BR 5153, BIORAD) bzw. dem Fujifilm plate 2340 (FUJI) für 6-80 h exponiert.

Die Intensität der dargestellten radioaktiven Proteinbanden des Elektropherogramms wurde mit Hilfe des Phosphoimagers GS-250 (BIORAD) bzw. dem Fluorescent Image Analyzer FLA 3000 (FUJIFILM, Japan) (Counts \* mm<sup>2</sup>) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem

Molecular Analyst 1.4-Auswerteprogramm (BIORAD) bzw. mit dem AIDA Auswerteprogramm (FUJIFILM).

### 3.8.2. Silberfärbung der Elektropherogramme

Die elektrophoretische aufgetrennten Proteine wurden im Gel durch Silberfärbung nach Merril et al. (1981) sichtbar gemacht.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Fixier-Lösung:	100 ml Methanol + 24 ml konz. Essigsäure + 76 ml Aqua dest.
Natriumthiosulfat- Lösung:	65 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ /500 ml Aqua dest.
Silbernitrat- Lösung:	100 mg $\text{AgNO}_3$ /50 ml Aqua dest. + 37 $\mu\text{l}$ Formalin
Entwickler-Lösung:	30 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ + 2,5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 250 $\mu\text{l}$ Formalin + 500 ml Aqua dest.

Das Gel wurde in einer Petrischale 1h mit Fixierer behandelt und im Anschluss 4x15 min mit reichlich Äthanol (50 %, vergällt) gespült. Daraufhin wurde das Gel 1 min mit Natriumthiosulfat-Lösung inkubiert. Nach Abgießen der Lösung wurde 3x 20s mit Aqua dest. gespült und das Gel 8 min mit Silbernitrat-Lösung versetzt. Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. (3x 20s) wurde das Gel für ca. 10 min mit Entwicklerlösung inkubiert. Zum Stoppen der Färbung wurde 1 N Essigsäure verwendet.

Das gefärbte Gel wurde anschließend mit einem Vakuumgeltrockner 45 min getrocknet.

### 3.8.3. Westernblot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine Nylonfolie (Hybond C extra, AMERSHAM) gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte zwischen zwei Lagen von Filterpapier (WHATMAN), die mit TRIS/Glycin-Puffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin; pH 7,4) getränkt waren, mit Hilfe der Semidry-Blotapparatur (BIORAD) 40 min bei 20 V, 500 mA oder der Tankblot-Apparatur (BIORAD) mit demselben Blotpuffer 1h bei 100 V, 250 mA unter Kühlung. Anschließend wurde die Membran in einer Petrischale mit 50 ml Magermilchlösung (2,5 g Magermilch/50 ml PBS/Triton 0,05 %) 1h geschüttelt. Nach Abgießen der Magermilchlösung

wurde dreimal mit PBS/Triton gewaschen. Danach wurde die Blotmembran mit 20 ml PBS/Triton und 2 µl Anti-Cathepsin S-Antikörper „Sascha“ 12 h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS/Triton wurde die Blotmembran mit 20 ml PBS/Triton und 20 µl Anti-Kaninchen-Antikörper-POD 1 h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS/Triton erfolgte die Nachweisreaktion.

#### **3.8.3.1. Auswertung von Westernblots mit Farbreaktion (Taketa, 1987)**

Der gewaschene Blot wurde mit

20 ml POD-Substratlösung: 20 mg NADH  
+ 6 mg Tetrazoliumsalz  
+20 ml PBS/Triton 0.05%  
+ 0,010 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%  
+ 0,010 ml Phenollösung

überschichtet.

#### **3.8.3.2. Auswertung von Westernblots mit dem ECL-System**

Der gewaschene Blot wurde mit 1,0 ml ECL-Nachweislösung versetzt, die zuvor aus den beiden ECL-Nachweis-Stammlösungen des ECL-protein-biotinylation-kites im Verhältnis 1:1 hergestellt worden war. Nach einer Inkubation der Membran von 1 min wurde das Reagenz abgegossen und die Membran in Saran-Folie (DOW Chemical Company) verpackt. Zur Belichtung wurden Kodak-Filme (AMERSHAM) für 5 sek - 5 min aufgelegt und anschließend mit der Entwicklermaschine Curix 60 (AGFA GAEVERT AG) entwickelt. Zur Quantifizierung der Signale wurden die entwickelten Filme mit dem ImageMaster VDS (FUJIFILM/PHARMACIA biotech) eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Phosphoimager (vergl. 3.8.1.) ausgewertet.

#### **3.8.3.3. Auswertung von Westernblots von biotinylierten Cathepsin S-Formen durch das ECL- System**

Nach SDS-PAGE und Westernblotting der biotinylierten Proteine wurde die Nylonmembran mit der Blockierungslösung des ECL-protein-biotinylation-kites (AMERSHAM): 1 g Blockierungs-Reagenzes + 20 ml PBS/Tween-20 (1 %) 1h inkubiert. Nach Abgießen der Blocklösung und dreimaligem Waschen der Blotmembran mit PBS/Tween-Lösung folgte eine einstündige Inkubation der Blotmembran mit 20 ml PBS/Tween-Lösung, denen 12,5 µl Streptavidin-HRP-Konjugat zugesetzt wurden. Nach wiederholten Spülungen der Blotmembran in PBS-

Tween erfolgte der Nachweis der biotinylierten Proteine mit dem ECL-System (siehe 3.8.3.2.).

### **3.9. Endocytoseuntersuchungen von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S, [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q, biotinyliertem Procathepsin S und reifem Cathepsin S**

Zur Untersuchung der Endocytose von Procathepsin S-N104Q und der daraus folgenden intrazellulären Sortierung wurden naive, unbehandelte HEK 293-Zellkulturen (50 ml) dreimal mit FKS-freiem DMEM gewaschen und mit Endocytose-Medium, das 1 ml [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-haltiges Medium, [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q-haltiges Medium bzw. gereinigtes biotinyliertes Procathepsin S oder gereinigtes biotinyliertes reifes Cathepsin S, 0,2 ml DMEM und 0,1 ml Methionin (100fach) enthielt, 0,2 – 8h bei 37°C , 7,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit bestand das Endocytosemedium aus 0,2 - 1,0 ml [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q-haltigem Medium, 1,0 – 0,2 ml DMEM (ohne Zusätze) und 0,1 ml Methionin (100fach). Die Konkurrenzexperimente wurden mit Endocytosemedien folgender Zusammensetzung durchgeführt: 1 ml [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q-haltiges Medium (Endkonzentration 0,3-0,9 µg/ml), 0,2 ml DMEM, 0,1 ml Methionin (100fach) und zur Konkurrenz 0,5 ml nicht markiertes, gereinigtes Procathepsin S-N104Q (Endkonzentration 1–12 µg/ml) bzw. zur Kontrolle 0,5 ml Puffer A. Nach Abschluss der Inkubation wurden nach Gewinnung der Medien die Zellextrakte hergestellt und die Cathepsin S-Formen aus den Zellextrakten immunpräzipitiert.

Begleitend zu diesen Experimenten wurde das Endocytosemedium vor bzw. nach Endocytose als Positivkontrolle bei der SDS-PAGE mitgeführt.

Die Gewinnung und Immunpräzipitation der Zellextrakte und Medien sowie die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie erfolgte wie unter 3.5.-3.7. und 3.8.1 beschrieben.

### **3.10. Bindungsexperimente von Procathepsin S-N104Q an Membranen intakter HEK 293-Zellen**

Die Bindung von Procathepsin S-N104Q an HEK 293-Zellmembranen wurde

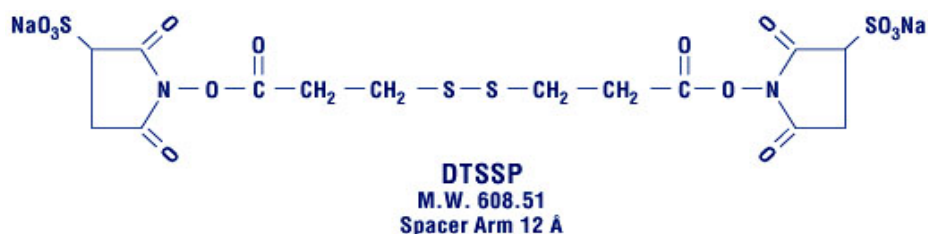
1. durch Zusatz von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q an naive HEK 293-Zellen und
2. an vitalmarkierten HEK 293-Zellen, die [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q exprimieren, sezernieren und endocytieren, nachgewiesen.

Naive HEK 293-Zellen (75 ml Kulturflaschen) wurden

1. mit 3 ml eines Mediums versetzt, das [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q enthielt (2,5 ml

[<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q-Medium (3.4.1.), 0,5 ml DMEM, 0,25 ml Methionin (100fach)), und 2h bei 37°C, 7,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

2. wurden HEK 293-Zellen (75 ml Kulturflaschen), die nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren mit 10 ml [<sup>35</sup>S]Methionin-Markierungsmedium (32 Mbq) 20h bei 37°C, 7,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit bzw. nach der Vitalmarkierung wurden die Medien gewonnen, zur Abtrennung möglicher abgelöster Zellen zentrifugiert und für die spätere Analytik eingefroren. Die noch anhaftenden Zellen wurden in beiden Versuchsansätzen ohne zwischengeschalteten Waschvorgang mit 3 ml einer 1,6 mM DTSSP-Lösung (DTSSP = 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidyl-propionat], homobifunctioneller N-hydroxysuccinimidester, wasserlöslich, nicht membrangängig, Thiol-spaltbar, in PBS gelöst) überschichtet und 1h bei Raumtemperatur inkubiert.



**Abb. 8: Strukturformel des homobifunktionellen Crosslinkers Dithiobis-[sulfosuccinimidyl-propionat] (DTSSP) (Pierce)**

Danach wurde die DTSSP-Lösung entfernt und die Zellen dreimal mit einem Imidazol/Saccharose-Puffer gewaschen und in 2,0 ml desselben Puffers abgeschabt, suspendiert, in einen EPPENDORF-Becher überführt, zentrifugiert (5 min bei 800g), mit 2,0 ml Imidazol/Saccharose-Puffer gewaschen und in 1,5 ml Imidazol/Saccharose-Puffer suspendiert, der E64 (2 µM) und PMSF (2 mM) enthielt. Es folgten die Herstellung des postnukleären Überstandes (siehe 3.11.1.) und eine Percoll-Gradienten-Zentrifugation (siehe 3.11.2.) des postnukleären Überstandes mit Fraktionierung von je 0,5 ml und die Immunpräzipitation der Cathepsin S-Komplexe mit dem Anti-Cathepsin S-Antikörper aus den Fraktionen (3.6.). Da der Crosslinker eine thiolspaltbare Gruppe enthält, können die Crosslinking-Produkte nachträglich durch Mercaptoethanol-Zusatz gespalten werden. Damit können das mögliche Membranbindungsmotiv und das daran gebundene Protein (Procathepsin S) durch SDS-PAGE getrennt und identifiziert werden.

Die Immunpräzipitate der Fraktionen wurden 5 min bei 100°C mit Mercaptoethanol-freiem bzw. Mercaptoethanol-haltigen SDS-Elektrophorese-Probenpuffer gekocht und anschließend

durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknen der Elektropherogramme erfolgte die Autoradiographie und Auswertung wie unter 3.8.1 beschrieben.

### **3.11. Zellfraktionierung**

#### **3.11.1. Herstellung des postnukleären Überstandes**

Die Zellsuspension (vergl. 3.10.) wurde in einem Potter-Homogenisator im Eisbad bei 3200 Umdrehungen/min und durch 20 Auf- und Abwärtsbewegung des Teflonpistills aufgeschlossen. Anschließend wurde das Homogenat 5 min bei 1300g bei 2°C zentrifugiert, wodurch die Zellkerne und Mitochondrien sedimentieren. Der Überstand wird als der postnucleäre Überstand bezeichnet.

#### **3.11.2. Percoll-Gradienten-Zentrifugation**

Zur Herstellung der Gradientenlösung wurden folgende Lösungen miteinander gemischt:

Gradientenlösung: 2,0 ml Percoll  
+ 1,0 ml Imidazol/Saccharose-Puffer, pH 7,4  
+ 7,0 ml Aqua dest.

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

3,5 ml Gradientenlösung wurden in ein 5,0 ml Zentrifugenröhrchen (Polyallomer centrifuge tubes, 11 x 60 mm, BECKMAN) pipettiert und mit 0,5 ml postnukleärem Überstand (vergl. 3.11.1.) überschichtet und 2 h bei 20000 U/min bei 4°C (BECKMAN-Ultrazentrifuge L 70, Rotor SW 60). Nach der Zentrifugation wurde der Gradient beginnend am Meniskus zu je 0,5 ml fraktioniert. Fraktion 1 entsprach der obersten Fraktion, Fraktion 8 der Bodenfraktion. Zur Entfernung des Percolls wurden die Fraktionen in Zentrifugengefäße (Zellulosepropionat-Zentrifugenbecher, 7 x 20 mm, BECKMAN) überführt und bei 40000 U/min 4°C 30 min zentrifugiert (BECKMAN-Ultrazentrifuge L70, Rotor 42.2 Ti). Die Überstände wurden zur Zerstörung sämtlicher Vesikel mit je 0,01 µl Triton X100 (10 %) versetzt und gemischt. Zur Identifizierung der subzellulären Fraktionen der Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgte zur Lokalisation der Lysosomen die Bestimmung der  $\beta$ -Hexosaminidase und zur Lokalisation der Membranen die Bestimmung der Phosphatidyl-Inositol-4-Kinase. Die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase war in der Fraktion 8 und die der Phosphatidyl-Inositol-4-Kinase in der Fraktion 3 am höchsten. Diese Verteilung stimmte mit früheren Experimenten überein (Nissler et. al., 1998).

### **3.11.3. Lysosomenpräparation (nach Ciechanover und Wiederanders, 1999)**

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von nicht glycosyliertem Procathepsin S im Vergleich zu Wildtyp-Procathepsin S wurden aus den entsprechenden Transfektanten Lysosomen präpariert. Von Zellen wurde postnucleärer Überstand hergestellt (vergl. 3.11.1.) und 5 min bei 20800g, 2°C, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment, welches die sedimentierten, intakten Lysosomen enthielt, wurde in Imidazol/Saccharose-Puffer suspendiert und erneut zentrifugiert. Die Waschung der Lysosomen wurde mehrfach wiederholt. Schließlich wurde dem Lysosomen-Sediment 2,0 ml Homogenisierungspuffer zugesetzt, der Triton X100 enthielt. Zur vollständigen Eröffnung der Lysosomen wurde das Homogenat 30 min auf Eis aufbewahrt. Nach einem Gefrier/Tau-Schritt wurde das Lysosomenhomogenat einer Potter-Homogenisation (3200 Umdrehungen/min, 20 Auf- und Abbewegung des Teflonpistills) unterzogen. Danach wurde das Homogenat zentrifugiert (50 min, 20800g, 2°C) und der Überstand gewonnen, der dem Lysosomenextrakt entspricht. Das abzentrifugierte Pellet, das die Lysosomenmembranen enthält, wurde mehrfach in Homogenisierungspuffer suspendiert, homogenisiert (Potter-Homogenisation) und zentrifugiert (50 min, 20800g, 2°C). Die Proteine des Lysosomenextraktes und der präparierten Lysosomenmembranen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen übertragen (Westernblot, vergl. 3.8.3.) und die Cathepsin S-Formen mit dem ECL-System (vergl. 3.8.3.3) nachgewiesen.

## **3.12. Leitenzymbestimmung**

### **3.12.1. Bestimmung der $\beta$ -Hexosaminidase in den Lysosomenfraktionen**

Die Bestimmung der Aktivität dieses lysosomalen Enzymes erfolgte nach Hall et al., 1978 unter Verwendung des chromogenen Substrates p-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid.

Substratlösung: p-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid, 10 mM in Citratpuffer,  
0,1 M, pH 4,6

Stopplösung: Glycin/NaOH, 0,4 M, pH 10,4

Reaktionsansatz: 0,01 ml Probe  
+ 0,10 ml Substrat

Inkubation: 30 und 60 min bei 37°C  
+ 1,00 ml Stopplösung

Nach Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C für 30 bzw. 60 min wurde die Reaktion durch Zusatz von 1,0 ml Stopplösung beendet. Am Photometer (Spekol 1200, CARL ZEISS



TECHNOLOGY) wurde bei 405 nm die Extinktion der Proben gemessen und die Aktivität berechnet.

### **3.12.2. Bestimmung der Phosphatidyl-Inositol-4-Kinaseaktivität**

Die Bestimmung dieser ausschließlich membranständigen Kinase, die als Leitenzym für Membranen benutzt wird, erfolgte nach Wetzker et al., 1991.

Reaktionsmedium: TRIS/HCl, 50 mM, pH 7,2; MgCl<sub>2</sub>, 60 mM; EGTA, 6 mM; TritonX100, 3%

Substratlösung 1: Phosphatidylinositol-Lösung (0,63 mM) in 50 mM TRIS /HCl, pH 7,2

Substratlösung 2: ATP-Lösung 2,5 mM  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP (1,48 MBq/ml in TRIS/HCl, 50 mM, pH 7,2; KCl, 125 mM

Stopplösung: 1,0 ml Hexan/Isopropanol (26 :14) + 0,2 ml HCl konz./KCl, 2 N

Reaktionsansatz: 0,050 ml Probe  
+ 0,025 ml Reaktionsmedium  
+ 0,050 ml Substratlösung 1  
+ 0,025 ml Substratlösung 2  
Inkubation 30 min bei 37°C  
+ 1,200 ml Stopplösung

Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zusatz der Stopplösung beendet. Nach Mischen und Phasentrennung wurden 0,5 ml der oberen (organischen) Phase abgenommen und mit 0,5 ml HCl (0,1 N) versetzt. Nach erneutem Mischen und Phasentrennung wurden 0,2 ml der oberen (organischen) Phase in 2,0 ml Szintillator eingebracht.

Die Messung der Radioaktivität des [<sup>32</sup>P]Phosphatidylinositols der organischen Phase erfolgte am TRI-CARB 2500 LSC Messgerät (CANBERRA-PACKARD GmbH).

### **3.13. Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **3.13.1 Microbiuretmethode nach Goa, 1953**

0,2 ml Proteinprobe wurde mit 0,2 ml 20 % iger Trichloressigsäure versetzt, gemischt und 1 h bei 20500g bei 20°C zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in je 0,5 ml Biuret-Reagenz (1 Teil CuSO<sub>4</sub> (0,7M)/Na-Citrat (0,6M) und 20 Teile NaOH (0,75M)) gelöst. Anschließend wurden 0,5 ml Aqua dest. zugesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit einer Proteineichkurve. Dazu wurde aus einer Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml 0,9 % NaCl) eine Eichkurve von 10 – 150 µg Protein/Testansatz pipettiert. Als Leerwert diente die Pufferlösung, in der das

Protein gelöst war. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 334 nm (Specol 1200 CARL ZEISS TECHNOLOGY).

### **3.13.2. Micro BCA Protein-Bestimmung**

Die Bestimmung erfolgte mit dem Test-Kit der Firma PIERCE. Das Reagenz zum Nachweis der  $\text{Cu}^+$ -Ionen enthält als Komplexbildner Bicinchonin-Säure, wodurch die Sensitivität der Bestimmung im Vergleich zur Microbiuret-Methode erhöht wird.

0,05-0,1 ml Enzymlösung wurden mit Puffer A auf 1,0 ml verdünnt. Anschließend wurde je 1 ml BCA-Reagenz (Arbeitsverdünnung) zupipettiert und 60 min bei 60°C inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mit einer 1:10-Verdünnung der Proteinstammlösung des Kits (2 mg/ml) im Bereich von 0–10 µg Protein/ml Puffer A. Als Leerwert diente Puffer A, Anschließend wurde je 1 ml BCA-Reagenz (Arbeitsverdünnung) zupipettiert und 60 min bei 60°C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 562 nm (Specol 1200 CARL ZEISS TECHNOLOGY).

### **3.14. Bestimmung der Triton X100 – Konzentration durch Fluorimetrie**

Die Triton X100-haltigen Procathepsin S-N104Q-Proben wurden zur Extraktion des Detergenz mit je 2 ml Hexan versetzt, vermischt und zentrifugiert (2 min 20500g). Je 1,0 ml Überstand wurde zur fluorimetrischen Bestimmung eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Triton X100-Eichkurve. Eine 2 mM Triton-Lösung wurde auf Endkonzentrationen im Bereich von 10–150µM verdünnt. Je 0,05 ml der einzelnen Eichverdünnungen wurden mit je 2 ml Hexan versetzt, vermischt und zentrifugiert (2 min 20500g). Als Leerwert diente die Pufferlösung, in der das Protein der Proben gelöst war. Die fluorimetrische Bestimmung erfolgte bei einer Excitationswellenlänge von 225 nm und einer Emissionswellenlänge von 305 nm (LS50B PERKIN ELMER).

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Reinigung von nicht glycosyliertem Procathepsin S Mutante N104Q**

Für die Durchführung der Bindungs- und Endocytoseexperimente ist die Verfügbarkeit ausreichend hoher Konzentrationen an Procathepsin S-N104Q in gereinigter Form eine Voraussetzung. Zur Reinigung der Procathepsin S-N104Q-Mutante wurde ein Verfahren angewandt, welches in unserem Labor für die Isolierung von Procathepsin S-Wildtyp entwickelt worden war (Wenz et al., nicht publiziert). Hierbei handelt es sich um eine Abfolge von drei aufeinanderfolgenden Chromatographien:

1. einer Con-A-Sepharose-Chromatographie mit Elution des Enzyms durch Methylmannopyranosid
2. einer hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose mit Elution des Enzyms mittels Triton X100 und
3. einer Gelfiltration mit Superdex G75

Für die Reinigung von Procathepsin S-N104Q kann die Con A-Sepharose-Chromatographie nicht angewendet werden, da dem Enzym die Oligosaccharidseitenkette fehlt, die Voraussetzung für eine Reinigung an der Con-A-Sepharose-Chromatographie ist.

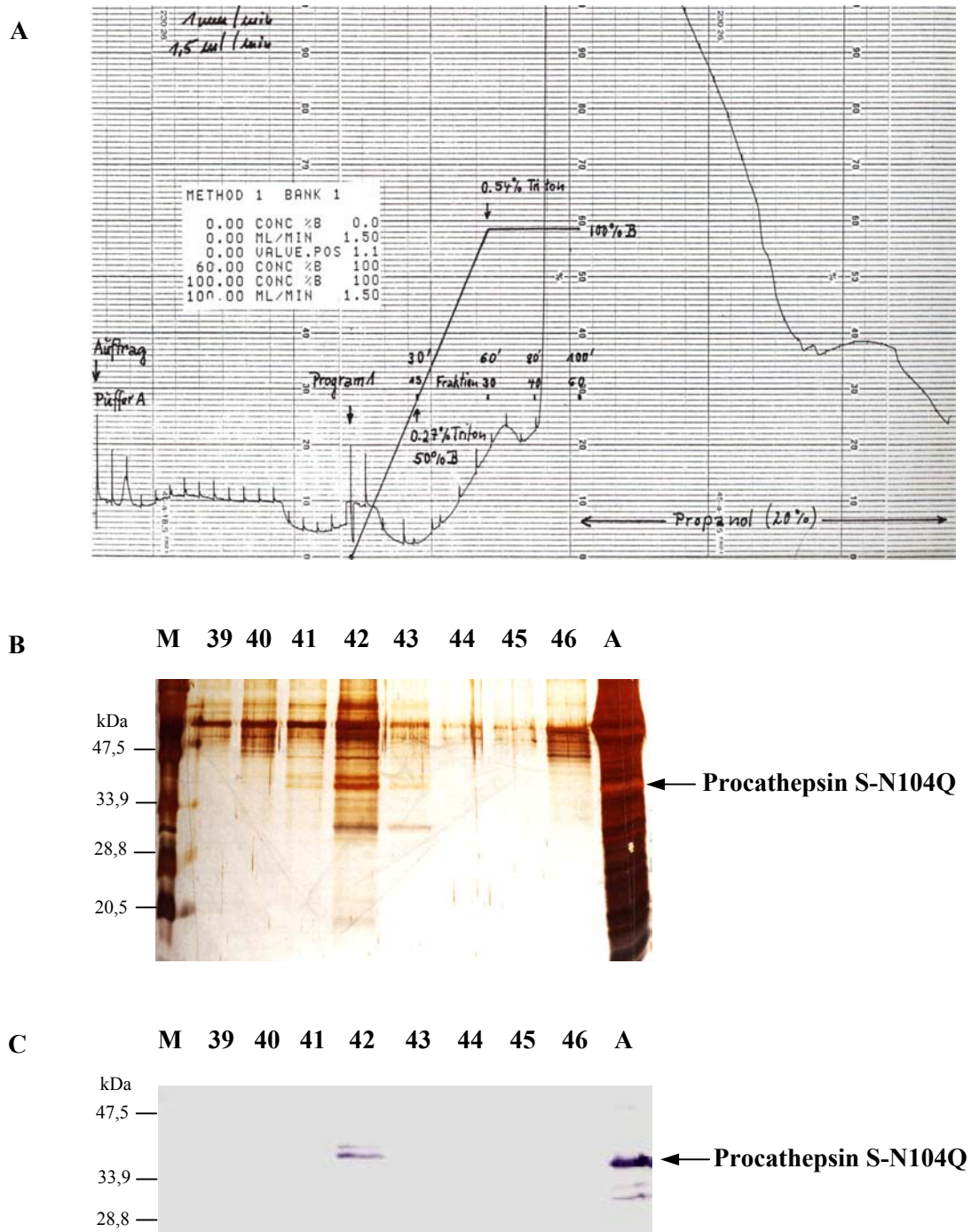
#### **4.1.1. Gewinnung des Procathepsin S-N104Q**

Als Ausgangsmaterial für die Chromatographien diene das Medium von HEK 293-Zellkulturen, die nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren und ins Medium sezernieren (Nissler et al., 1998). Die Zellen wurden in 5-10 Kulturflaschen (75 ml) bis zur Konfluenz kultiviert. Sie wurden 3x mit FKS-freiem DMEM gewaschen und 24 h in FKS-freiem DMEM kultiviert. Anschließend wurden die Medien (je 10 ml) gewonnen, vereinigt, zur Entfernung abgelöster Zellen zentrifugiert (5 min, 800g) und mit einer Amicon-Druckfiltrationszelle auf 2-5 ml konzentriert. Während der Konzentrierung wurde das Procathepsin S-N104Q-Präparat mit dem Chromatographie-Puffer A umgepuffert.

#### **4.1.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie von Procathepsin S-N104Q an Phenylsepharose HiLoad 16/10**

2 ml konzentriertes Procathepsin S-N104Q-Kulturmedium wurde auf eine Phenylsepharose-Chromatographie-Säule HiLoad 16/10 aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 150 ml Puffer A gespült. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem Triton X100-Gradienten 0 - 0,54 % Triton X100 in 90 ml Puffer A, gefolgt von einer weiteren Elution mit

75 ml 0,54 % Triton X100 in Puffer A. Abb. 9A zeigt das Elutionsprofil der hydrophoben Interaktionschromatographie. Das fraktionierte Eluat wurde einer SDS-PAGE mit Immunoblot (Abb. 9C) unterzogen. Der Proteinnachweis in den Fraktionen erfolgte durch Silber-



**Abb. 9: Nachweis von Proteinen und Procathepsin S-N104Q in den Fraktionen der hydrophoben Interaktions-Chromatographie**

**A** Elutionsprofil der Phenylsepharose-Chromatographiesäule HiLoad 16/10  
**B und C:** Elektropherogramme nach SDS-PAGE der Fraktionen 39-46 und dem Procathepsin S-N104Q-Ausgangsmaterial (A), Proteinstandards (M)  
**B** Proteinnachweis durch Silberfärbung  
**C** Westernblot

färbung eines parallel mitgeführten Gels. Es zeigte sich eine gute Auftrennung des Proteingemisches, wobei v.a. größere Moleküle ( $> 40$  kDa) abgetrennt worden (Abb. 9B). Mit einer Amicon-Druckfiltrationszelle wurden die Procathepsin S-N104Q-haltigen Fraktionen 41-43 auf 1,5 ml konzentriert und mit Puffer A umgepuffert.

#### **4.1.2.1. Versuche zur Entfernung des Triton X100 aus dem Procathepsin S-N104Q-Präparat nach Phenylsepharose-Chromatographie**

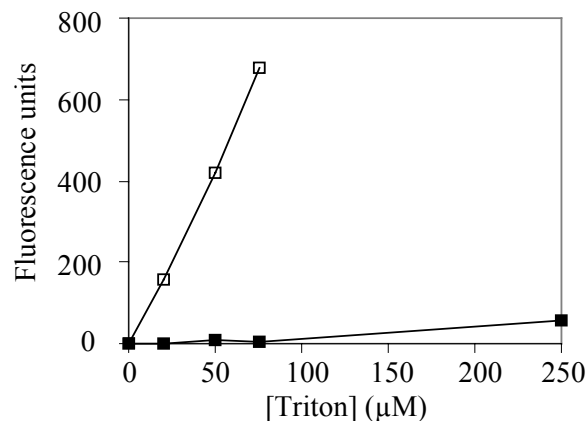
Im folgenden wurde versucht, Triton X100 aus dem konzentrierten und umgepufferten Procathepsin S-N104Q-Präparat nach Phenylsepharose-Chromatographie abzutrennen. Das ist erforderlich, da die mit dem Procathepsin S-N104Q geplanten Experimente ein Detergens-freies Präparat erfordern, um Störungen und Artefakte bei diesen Experimenten auszuschließen. Bei den Endocytoseexperimenten insbesondere bei der Untersuchung der Kompetition von markiertem Enzym mit nicht markiertem Procathepsin S-N104Q, sollten konzentrierte Procathepsin S-N104Q-Lösungen eingesetzt werden. Der Gehalt von Detergens im Procathepsin S-Präparat birgt einerseits die Gefahr der Veränderung der Integrität der Plasmamembran der HEK 293-Zellen, andererseits die Blockierung der Bindungsmotive sowohl im Procathepsin S-Molekül als auch im putativen Bindungsprotein der Membran.

Die Tritonkonzentration in dem Procathepsin S-N104Q-Präparat nach Phenylsepharose-Chromatographie, das aus den vereinigten enzymhaltigen Fraktionen 41-43 nach Konzentrierung und mehrmaligem Umpuffern mit Puffer A hervorgegangen war, betrug 130 nMol/ml (130  $\mu$ M). Der Proteingehalt der Lösung betrug 0,1 mg/ml. Unter Zugrundelegung der Molmasse des monomeren Enzyms von 35,9 kDa und Vernachlässigung der Spuren von Fremdproteinen in den gereinigten Enzympräparaten resultiert ein Verhältnis von ca. 50 Mol Triton/Mol Procathepsin S-N104Q.

Die Entfernung von Triton X100 aus dem Procathepsin S-N104Q-Präparat erfolgte mit Hilfe von BioBEADS SM2 der Firma BIORAD.

Als erstes wurde die Entfernung von Triton X100 aus wässrigen Tritonlösungen mit BioBEADS geprüft. Dazu wurden Triton X100-Lösungen im Konzentrationsbereich von 20–250  $\mu$ M mit je 160 mg BioBEADS versetzt. Die Proben wurden zentrifugiert, der Überstand gewonnen und das Triton X100 mit je 2 ml Hexan ausgeschüttelt. Anschließend erfolgte die fluorimetrische Bestimmung des Tritons in den Hexanphasen. Zur Kalibrierung dienten Tritonlösungen mit Konzentrationen von 20–75  $\mu$ M. Die Abb. 10 zeigt die nahezu vollständige Entfernung von Triton X100 durch BioBEADS aus diesen Lösungen.

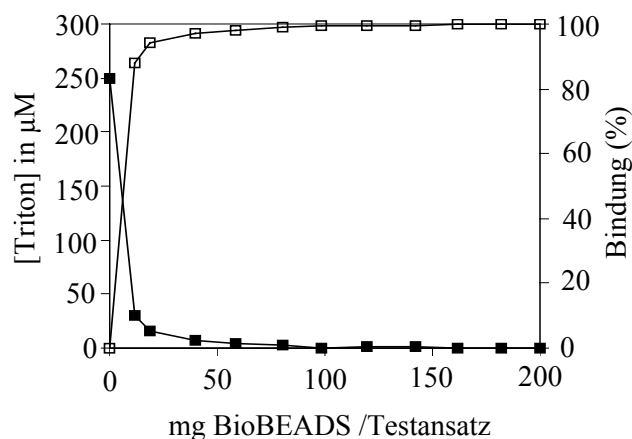
Nachfolgend wurde die optimale Menge Beads für die Entfernung von Triton X100 aus einer 250  $\mu\text{M}$  Tritonlösung ermittelt. Hierzu wurden je 200  $\mu\text{l}$  einer 250  $\mu\text{M}$  Triton-Lösung mit 10-200 mg Beads versetzt. Nach Mischen, Zentrifugation und Hexanzusatz erfolgte im Überstand die Bestimmung der Tritonkonzentration. In Abb. 11 ist das Ausmaß der Tritonentfernung durch unterschiedliche Mengen an zugesetzten BioBEADS zu erkennen. 10 mg BioBEADS entfernten das Triton zu 88 %, 80 mg BioBEADS zu 99 % aus dieser Lösung.



**Abb. 10: Entfernung von Triton X100 aus wässrigen Lösungen durch BioBEADS**

0,2 ml Triton X100-Lösung (20 $\mu\text{M}$  – 250 $\mu\text{M}$ ) wurden mit je 160 mg BioBEADS versetzt, nach Abzentrifugation der BioBEADS wurden in den Überständen nach Zusatz von 2 ml Hexan die Tritonkonzentration fluorimetrisch ( $\lambda_{\text{Excitation}}$  225 nm,  $\lambda_{\text{Emission}}$  305 nm) bestimmt.

- nach Zusatz von je 160 mg BioBEADS
- Kontrolle (ohne BioBEADS)



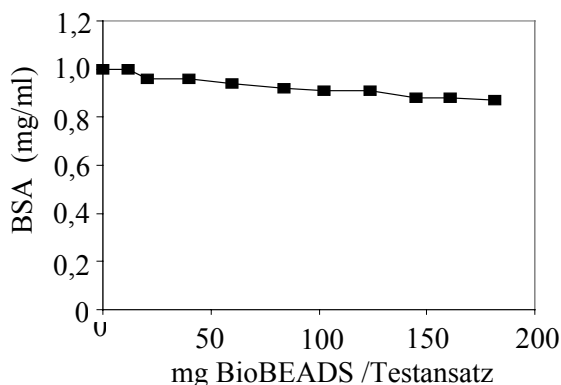
**Abb. 11: Entfernung von Triton X100 aus einer 250  $\mu\text{M}$  Lösung: Abhängigkeit von der eingesetzten Menge BioBEADS**

0,2 ml einer 250  $\mu\text{M}$  Triton X100-Lösung wurde mit 10-200 mg BioBEADS versetzt, nach Abzentrifugation der BioBEADS wurden in den Überständen nach Zusatz von 2 ml Hexan die Tritonkonzentration fluorimetrisch ( $\lambda_{\text{Excitation}}$  225 nm,  $\lambda_{\text{Emission}}$  305 nm) bestimmt.

- Triton X100-Konzentration nach BioBEADS-Behandlung in  $\mu\text{M}$
- Bindung von Triton an BioBEADS (%)

Weiterhin wurde geprüft, ob bei der Entfernung von Triton X100 Verluste an Protein auftreten. Hierzu wurden je 400  $\mu\text{l}$  einer Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml) mit 10 – 180

mg BioBEADS versetzt. Nach Sedimentation der Beads erfolgte im Überstand eine Proteinbestimmung. Die Abb. 12 zeigt, dass der Proteinverlust durch die Beadsbehandlung gering ist. Er beträgt bei Einsatz von 80 mg BioBEADS weniger als 10%.



**Abb. 12: Ausmaß der Bindung von Proteinen (BSA) an BioBEADS.**  
 0,4 ml BSA-Lösung (1 mg/ml) wurden mit 10–180 mg Beads behandelt.  
 Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand (Goa, 1956)

Nach diesen Voruntersuchungen wurden 0,5 ml des Procathepsin-S-N104Q-Präparates der Phenylsepharose-Chromatographie (vergl. 4.1.2), das 130  $\mu\text{M}$  Triton/l enthielt, mit 50 mg BioBEADS behandelt. Die Ergebnisse der Triton- und Proteinkonzentrationsbestimmung sind in der Tab. 1 wiedergegeben.

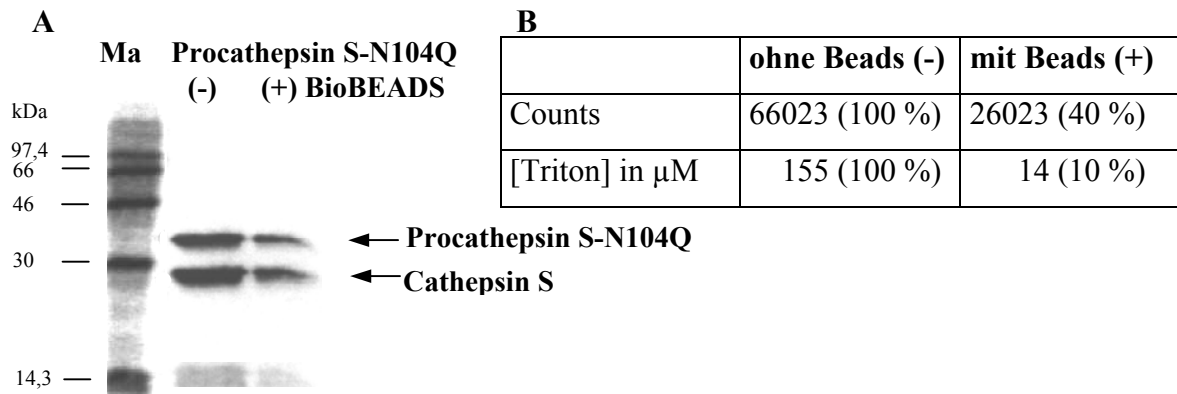
**Tab. 1: Behandlung eines Procathepsin S-N104Q-Präparates nach Phenylsepharose-Chromatographie mit BioBEADS:**  
**Einfluss auf die Konzentration von Triton X100 und Procathepsin S-N104Q**

	vor Beadsbehandlung	nach Beadsbehandlung
[Triton] ( $\mu\text{M}$ )	130 (100 %)	30 (23 %)
[Protein] ( $\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$ )	54 (100 %)	36 (67 %)

Die Tab. 1 legt dar, dass Triton X100 aus der Procathepsin S-N104Q-Lösung nur zu etwa 75% entfernt wurde, gleichzeitig sank der Proteingehalt von Procathepsin S-N104Q auf ca. 65% ab.

Um den Proteinverlust zu vermeiden und die Entfernung des Tritons zu verbessern, wurde in weiteren Experimenten Anzahl und Dauer der Extraktionen mit BioBEADS, die Beadsmenge und der Verdünnungsgrad des Procathepsin S-N104Q-Präparates variiert. Da die Proteinbestimmung angesichts der niedrigen Procathepsin S-N104Q-Konzentrationen an ihre Nachweisgrenze stieß, wurden diese Experimente mit [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q durchgeführt. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte durch Phosphoimaging.

1 ml einer [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-Lösung nach Phenylsepharose-Chromatographie wurde nacheinander 4x mit je 25 mg BioBEADS behandelt.



**Abb. 13: Tritonentfernung aus einem [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-Präparat nach Phenylsepharose-Chromatographie durch mehrfache (4x) BioBEADS-Behandlung**  
**A:** Autoradiogramm der Immunpräzipitation von je 250  $\mu\text{l}$  [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-haltigem Medium ohne (-) und nach (+) Behandlung mit den BioBEADS  
**B:** Quantitative Auswertung der Procathepsin S-Signale des Autoradiogrammes sowie Bestimmung der Tritonkonzentration in den Präparaten vor und nach BioBEADS-Behandlung

Abb. 13 gibt das Autoradiogramm der SDS-PAGE nach dieser Behandlung wieder. Die Quantifizierung zeigte, dass durch eine fraktionierte Extraktion Triton X100 nicht vollständig entfernt und die Proteinverluste nicht gesenkt werden konnten.

Eine 45-minütige Inkubation der Procathepsin S-N104Q-Lösung mit 25 mg Beads ergab zwar eine vollständige Entfernung des Tritons, aber auch eine Senkung des Proteingehaltes um mehr als 50 %. Auch der Einsatz einer 1:2 Verdünnung des Procathepsin S-N104Q-Präparates für die Extraktionsexperimente verringerte die Proteinverluste nicht.

#### 4.1.2.2. Gelchromatographie von Procathepsin S-N104Q nach Phenylsepharose-Chromatographie an Superdex G75

Aufgrund der ungenügenden Beseitigung des Tritons und der dabei auftretenden Proteinverluste wurde auf die BioBEADS-Behandlung verzichtet. Es wurde untersucht, ob Triton X100 durch nachfolgende Gelfiltration abgetrennt werden kann.

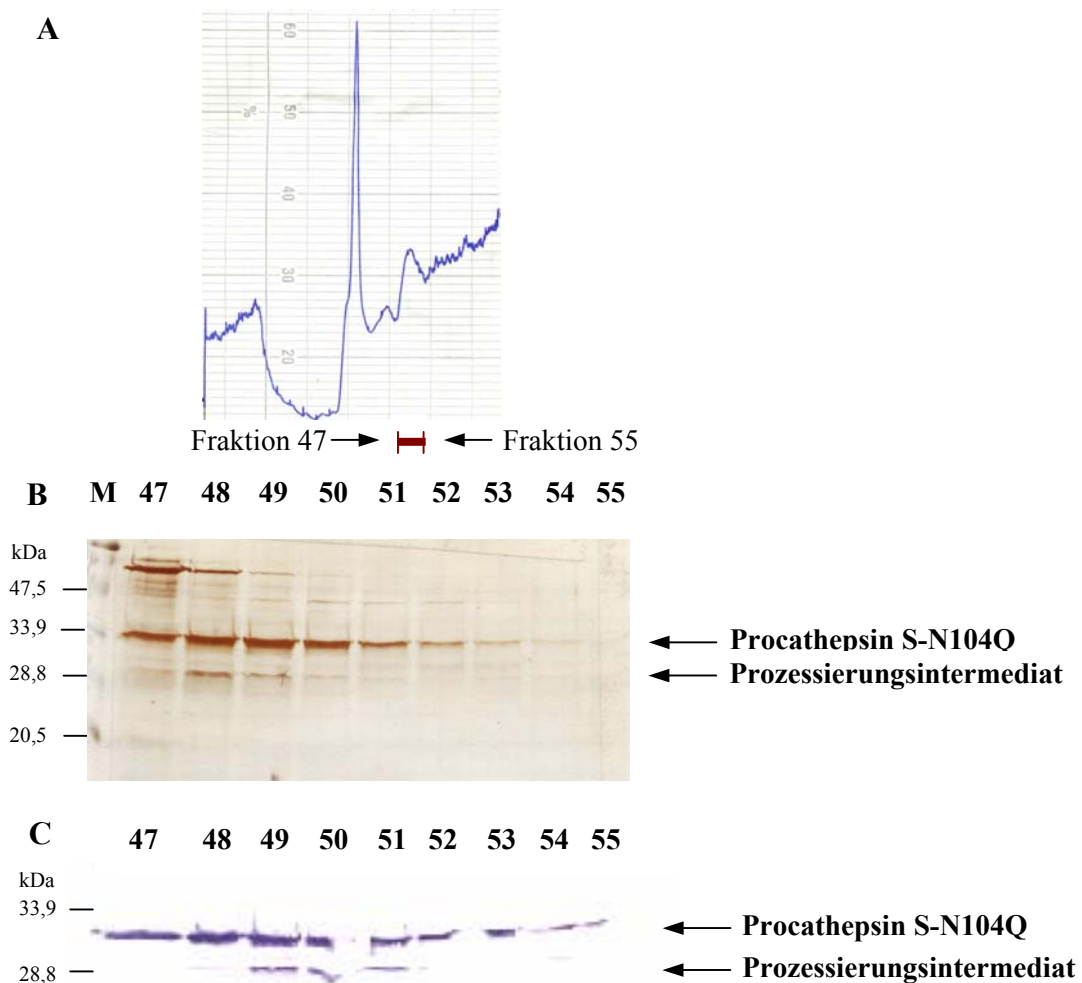
Dazu wurden 1,5 ml konzentrierte Procathepsin-S-N104Q-Lösung nach Phenylsepharose-Chromatographie (vergl. 4.1.2.) auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex G75 HiLoad 16/60), die mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit demselben Puffer. Die Identifikation des Procathepsin S-N104Q in den Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE und Westernblot. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit einer Amicon-Druckfiltrationszelle auf 1,5 ml konzentriert und mit Puffer A umgepuffert. Die Bestimmung



der Tritonkonzentration zeigte eine deutliche Senkung jedoch keine vollständige Entfernung des Detergens. Das Triton X100-Procathepsin S-N104Q-Verhältnis betrug immerhin noch 12 Mol Triton/Mol Procathepsin S-N104Q. Um die Kontamination des Präparates mit Triton zu vermeiden, wurde auf die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie verzichtet und versucht das Enzym ausschließlich durch Gelfiltration zu reinigen.

#### 4.1.3. Gelchromatographie von Procathepsin S-N104Q an Superdex G75 HiLoad 26/60

Als Ausgangsmaterial dienten die vereinigten Kulturmedien von 10 Kulturflaschen (75 ml) mit HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q sezernieren (vergl. 4.1.1.).



**Abb. 14: Nachweis von Procathepsin S-N104Q in den Fraktionen der Gelfiltration (HiLoad 26/60 Superdex G75)**

**A:** Elutionsprofil der Gelfiltration: 1,5 ml konzentriertes Procathepsin S-N104Q-haltiges Medium (Ausgangsmenge 200 ml) wurden aufgetragen und mit Puffer A eluiert, Fließgeschwindigkeit 3 ml/min, Fraktionierung je min, Detektion: Messung der Absorption bei 280 nm

**B und C:** Elektropherogramme nach SDS-PAGE der Fraktionen 47-55, Fraktionen 48-52 vereinigt

**B:** Proteinnachweis – Silberfärbung

**C:** Westernblot

200 ml Medium wurden durch Druckfiltration auf 1,5 ml konzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule Superdex G75 HiLoad 26/60 aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 90 ml Puffer A (Abb. 14A). Der Nachweis des Cathepsins in den Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE und Immunoblot, die Reinheit der Fraktionen wurde nach Silberfärbung beurteilt (Abb. 14B, C). Die Procathepsin S-N104Q-haltigen Fraktionen 48-52 wurden vereinigt und mit einer Amicon-Druckfiltrationszelle auf 1,5 ml konzentriert. Die Analytik zeigte eine hohe Reinheit des Procathepsin S-N104Q-Präparates.

#### **4.2. Konzentrierung von Procathepsin S-N104Q**

Um die bei der chromatographischen Reinigung auftretende Verdünnung der Präparate auszugleichen und in der Absicht, möglichst hochkonzentrierte Enzymlösungen zu gewinnen, wie sie z.B. für die Konkurrenzexperimente (vergl. 4.4.) erforderlich sind, wurden die Procathepsin S-N104Q-haltigen Eluate mit einer Amicon-Druckfiltrationszelle konzentriert. Bei der Westernblot-Analyse der konzentrierten Säuleneluate wurden im Vergleich zu den unkonzentrierten Lösungen große Verluste an Procathepsin S-N104Q beobachtet. Procathepsin S-N104Q war nicht im Filtrat nachweisbar und es gab keinen Hinweis auf einen proteolytischen Abbau des Enzyms. Es wurde vermutet, dass erhebliche Mengen an Procathepsin S-N104Q an der Filtrationsmembran adsorbiert wurden. Mit Hilfe von gelchromatographierten [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q konnte die Adsorption nachgewiesen werden: nach dem Konzentrierungsvorgang wurde im Konzentrat und im Filtrat die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie gemessen. Tab. 2 demonstriert die auftretenden Verluste. Nach Einbringen der Filtrationsmembran in den Szintillationscocktail ergab die Messung der Radioaktivität, dass große Mengen von Procathepsin S-N104Q an die Filtrationsmembran gebunden werden (Tab. 2, Spalte 6). Um die Verluste an Procathepsin S-N104Q zu verringern, wurden Versuche unternommen, die Adsorption des Enzyms an die Membran zu verringern, wie z. B. durch die Verwendung von Druckfiltrationszellen mit geringerer Filtrationsfläche. Des weiteren erfolgte die Konzentrierung des Precursors mit Einwegkonzentratoren Vivaspin (VIVASCIENCE) mit Filtrationsmembranen aus Cellulosetriacetat bzw. aus regenerierter Cellulose, die speziell für die verlustarme Konzentrierung von hydrophoben Proteinen ausgelegt sind. Tab. 2 verdeutlicht, dass die Verluste nicht reduziert wurden. Aus diesen Gründen wurde auf die Konzentrierung von Säuleneluat und Medien weitestgehend verzichtet, was zu experimentellen Einschränkungen führte (Vergl. 4.3.3, 4.4).

**Tab. 2: Konzentrierung von Procathepsin S-N mit unterschiedlichen Membrantypen und Konzentrierungssystemen**  
Bestimmung der Radioaktivität mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie

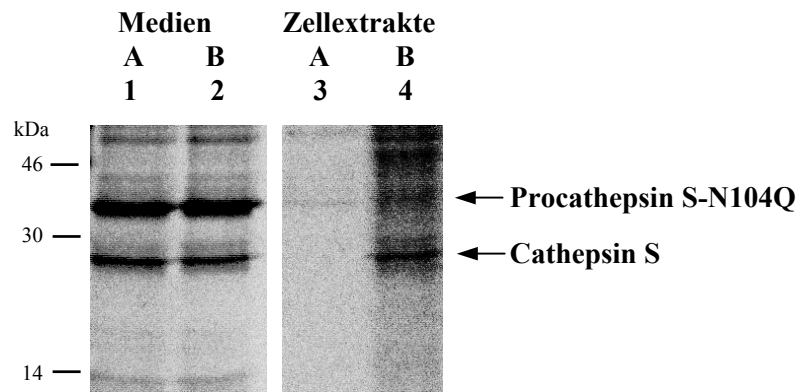
System	Membrantyp	Säuleneluat ml	cpm	Konzentrat ml	cpm	Filtrat cpm	Membran cpm	Verlust %
Amicon	YM 10 10000 MWCO	8	3984	0,5	1010	1100	1041	65
Vivaspin 6	Polyethersulfon 10000 MWCO	12	55800	0,4	900	13680	33100	98
Vivaspin 500	Cellulosetriacetat 5000 MWCO	3	1320	0,3	200	75	652	84
Vivaspin 2	regenerierte Cellulose 10000 MWCO	3	426	0,3	66	60	202	82

#### 4.3. Endocytose von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen

##### 4.3.1. Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Endocytose

Zum Nachweis von Bindung und Endocytose von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q wurden unbehandelte HEK 293-Zellen mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q bei 2°C und bei 37°C 8h inkubiert. Anschließend wurden die Medien gewonnen und die Zellen mehrmalig mit PBS gewaschen. Nach Herstellung der Zellextrakte wurden die Cathepsin S-Formen aus den Zellextrakten und Medien immunpräzipitiert (vergl. 3.5., 3.6.).

In Abb. 15 ist das Autoradiogramm der Immunpräzipitate nach elektrophoretischer Auftrennung und Phosphoimaging dargestellt. Bahn 4 zeigt den Zellextrakt der HEK 293-Zellen nach einer Endocytosezeit von 8h und einer Inkubationstemperatur von 37°C. Es ist sowohl Procathepsin S-N104Q als auch reifes Cathepsin S nachweisbar. Bei dem Precursor handelt es sich um das membrangebundene oder endocytierte Procathepsin S, das sich auf dem Weg in das endosomale/lysosomale Kompartiment befindet. Unter Berücksichtigung früherer Experimente bei denen ausschließlich Procathepsin S zur Endocytose angeboten wurde, ist auch in diesem Fall anzunehmen, dass reifes Cathepsin S durch intrazelluläre Prozessierung entstanden ist. Im Zellextrakt des Vergleichsansatzes bei einer Inkubationstemperatur von 2°C (Bahn 3) ist nur Procathepsin S-N104Q sichtbar. Da bei 2°C keine Endocytose stattfindet, ist anzunehmen, dass es sich um membrangebundenes Procathepsin S handelt. Aus dem gleichen Grund kann eine intrazelluläre Reifung ausgeschlossen werden.



**Abb. 15: Bindung und Endocytose von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur**

**A:** Unbehandelte HEK 293-Zellen wurden auf 2°C abgekühlt und mit [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-haltigem Medium 8h bei 2°C inkubiert.

**B:** Unbehandelte HEK 293-Zellen wurden mit [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-haltigem Medium 8 h bei 37°C inkubiert.

Gewinnung der Medien und Herstellung der Zellextrakte. Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen aus den Zellextrakten und Endocytosemedien.

Bahn 1, 2: [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-haltige Endocytosemedien nach Inkubation (8h) mit unbehandelten HEK 293-Zellen bei 2°C (1) und 37°C (2)

Bahn 3, 4: Zellextrakte von HEK 293-Zellen nach Inkubation (8h) mit [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q bei 2°C (3) und 37°C (4)

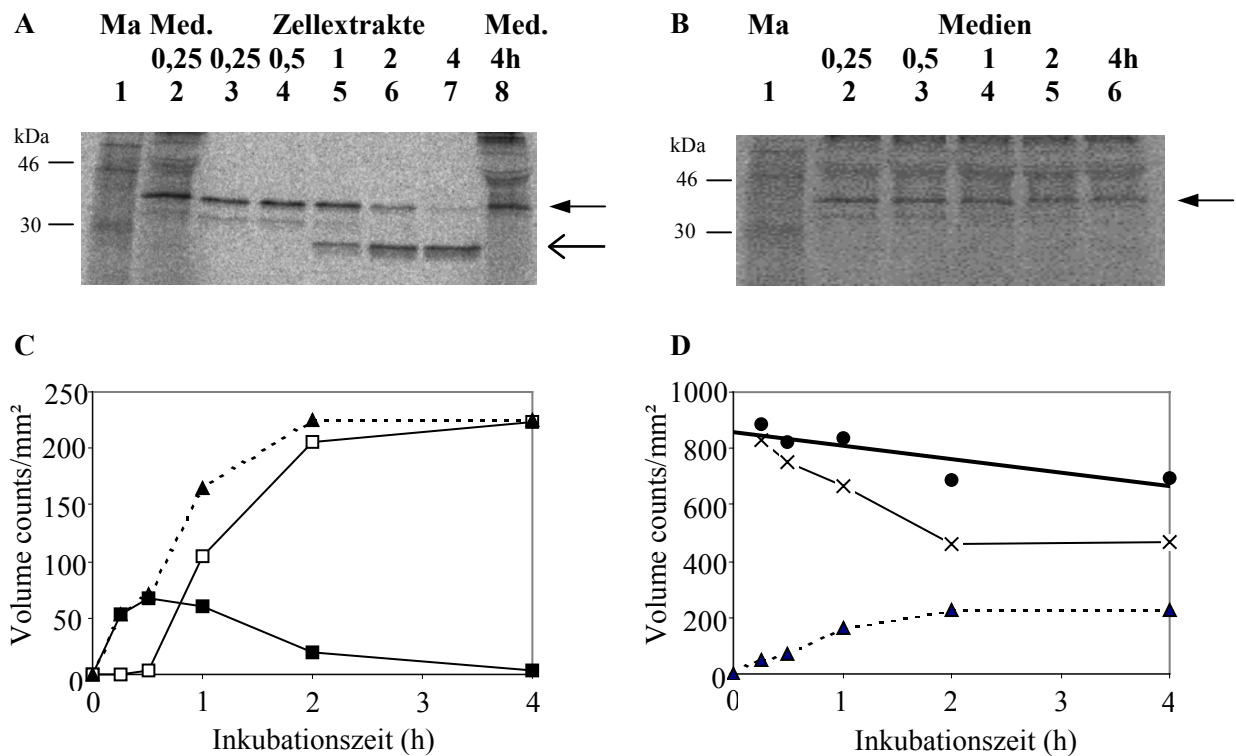
Das Medium enthält am Ende des Endocytoseexperimentes (8 h, vergl. Abb. 15 Bahn 1, 2) signifikante Mengen an reifem Enzym, da aber kein reifes Enzym im Zellextrakt nachgewiesen wurde, kann geschlossen werden, dass reifes Cathepsin S bei 2°C nicht gebunden wird. Angesichts der schwach dargestellten Bande ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich reifes Cathepsin S aufgrund des im Vergleich zu Procathepsin S geringeren Methioningehaltes dem Nachweis entzieht.

#### 4.3.2. Abhängigkeit der Endocytose von der Inkubationszeit

Zur Charakterisierung der Endocytose wurde die Abhängigkeit der Aufnahme von nicht glycosyliertem [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen im Vergleich zur Aufnahme von Procathepsin S-Wildtyp von der Endocytosezeit untersucht. Dazu wurden naive konfluente HEK 293-Zellen mit Endocytosemedien, welche [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q bzw. [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-Wildtyp enthielten, bei 37°C inkubiert. Nach den Inkubationszeiten von 0,25-8 h wurden die Medien gewonnen, die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und lysiert. (vergl. 3.5.). Die Cathepsin S-Formen wurden aus den Zellextrakten immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Phosphoimaging identifiziert und quantifiziert. Die Messwerte der Phosphoimager-Auswertung der radioaktiven Proteinbanden (volume

counts/mm<sup>2</sup> -bkg) wurden zur Berücksichtigung des unterschiedlichen Methioningehalts von Procathepsin S (10 Methionine/Mol) und von reifem Enzym (3 Methionine/Mol) normiert.

Abb. 16A zeigt das Autoradiogramm der Endocytose von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-Wildtyp durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit den Endocytosemedien. Bereits nach 15 min ist Procathepsin S in den Zellen nachweisbar. Nach einer Endocytosezeit von 1h wurde neben Procathepsin S auch reifes Cathepsin S gefunden. Die quantitative Auswertung (Abb. 16C) zeigt einen stetigen Anstieg der Procathepsin S-Konzentration in den



**Abb. 16: Endocytose von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S (Wildtyp) durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.**

HEK 293-Zellkulturen wurden mit identischen Mengen eines [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-haltigen Mediums 0,25 – 4h inkubiert. SDS-PAGE von Medien und Immunpräzipitaten der Cathepsin S-Formen aus den Zellextrakten, Autoradiographie, Phosphoimaging

**A:** Autoradiogramm der Immunpräzipitate der Zellextrakte

Bahn 1: [<sup>14</sup>C]Marker

Bahn 2, 8: Endocytosemedium nach Inkubationszeiten von 0,25h bzw. 4h

Bahn 3-7: Zellextrakte nach 0,25 – 4h Inkubationszeit

**B:** Autoradiogramm der Medien nach Endocytose

Bahn 1: [<sup>14</sup>C]Marker

Bahn 2-6: Medien am Ende der Inkubationszeit von 0,25 – 4h

← Procathepsin S, ← Cathepsin S

**C:** Quantitative Auswertung des Autoradiogrammes von A

■ Procathepsin S

□ Cathepsin S

---▲--- Σ (Procathepsin S, Cathepsin S)

**D:** Konzentration der Cathepsin S-Formen im Medium und in den Zellextrakten in Abhängigkeit von der Endocytosezeit.

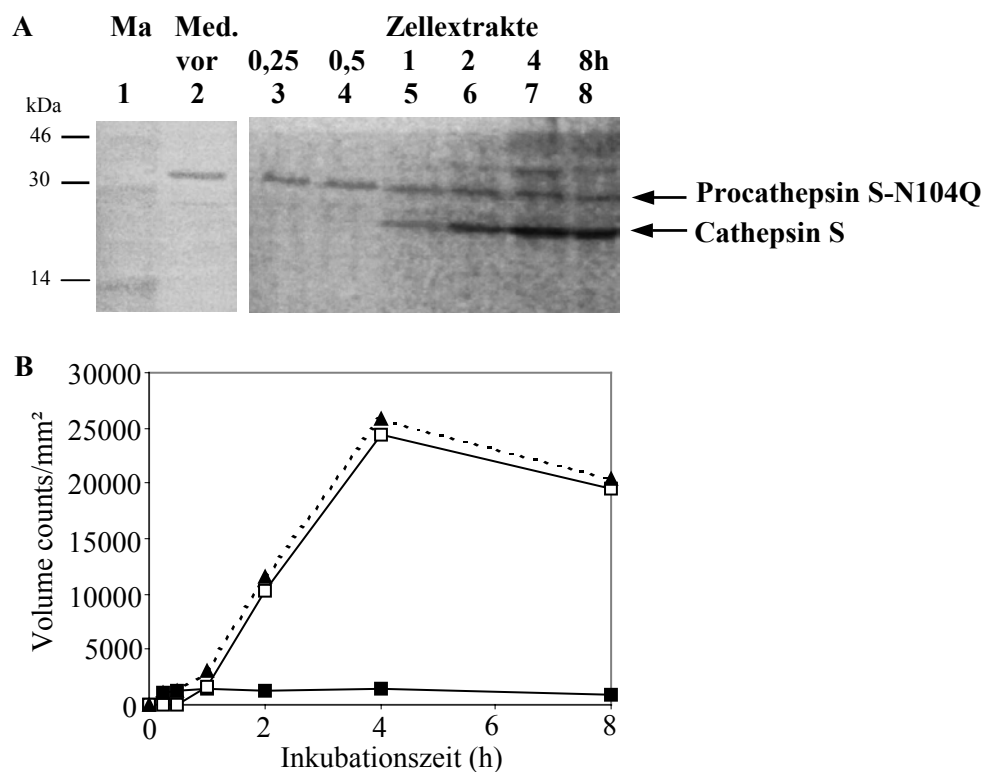
---▲--- Σ (Procathepsin S, reifes Cathepsin S) im Zellextrakt

—X— Procathepsin S-Gehalt des Mediums

● Σ (Zellextrakt und Medium) – Wiederfindung

Zellen, die nach einer Inkubationszeit von 30 min ein Maximum erreicht und danach wieder absinkt. Nach 4 Stunden sind nur noch Spuren an Procathepsin S erkennbar. Der Gehalt an reifem Cathepsin S steigt ebenfalls mit der Dauer der Inkubation an, übersteigt nach 1h den des Precursors und erreicht nach 2 Stunden ein Maximum (Plateau). Die Analyse der Medien nach Abschluss der Endocytoseexperimente ergab, dass die Procathepsin S-Konzentration innerhalb von 4 Stunden auf 50 % absinkt. Die Abnahme entspricht der Aufnahme des Precursors durch die Zellen, wie aus der Summe der bestimmten Cathepsin S-Formen des Zellextraktes und des Mediums hervorgeht (Abb. 16D). Das Absinken dieser Summe um lediglich 15 % schließt größere Verluste aus; Hinweise auf proteolytischen Abbau waren nicht erkennbar (Abb. 16B).

Bei der Endocytose von nicht glycosyliertem [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q (Abb. 17) ist ebenfalls nach 15 min Procathepsin S-N104Q und nach einer Stunde reifes Cathepsin S im Zellextrakt nachweisbar.



**Abb. 17: Endocytose von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

**A:** HEK 293-Zellkulturen wurden mit identischen Mengen eines [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-haltigen Mediums 0,25 – 8h inkubiert. Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen aus den Zellextrakten, SDS-PAGE, Autoradiographie, Phosphoimaging

Bahn 1: [ $^{14}\text{C}$ ]Marker

Bahn 2: Ausgangsmedium

Bahn 3-8: Zellextrakte nach 0,25 – 8h Inkubationszeit

**B:** Quantitative Auswertung des Autoradiogrammes

—■— [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q

—□— Cathepsin S

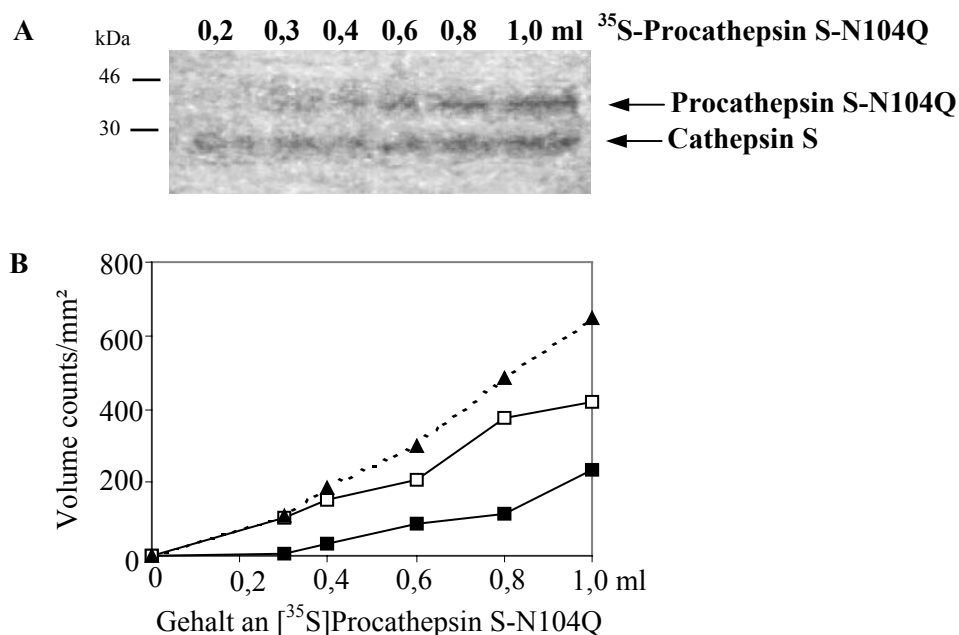
--▲-- Σ (Procathepsin S, Cathepsin S)

Das Maximum der Procathepsin S-N104Q-Konzentration wird jedoch erst nach einer Stunde, das des reifen Cathepsin S erst nach 4 h erreicht. Im Gegensatz zum Wildtyp bleibt der Gehalt beider Formen über mehrere Stunden konstant.

Da den Zellen ausschließlich Procathepsin S-N104Q angeboten wurde (Abb. 17, Bahn 2), kann das Auftreten von reifem Cathepsin S in den Zellextrakten nur das Ergebnis der limitierten Proteolyse des Precursors sein. Da diese nur im lysosomalen Kompartiment stattfindet, muss das nicht glycosylierte Proenzym auf dem endocytotischen Weg in die prälysosomalen/lysosomalen Vesikel gelangt sein (Pfad B in Abb. 6).

#### 4.3.3. Abhängigkeit der Endocytose von der [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-Konzentration

Naive HEK 293-Zellen wurden mit je 1 ml Endocytosemedium mit ansteigenden Konzentrationen an Procathepsin S-N104Q 1 h bei 37°C, 7,5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Das Endocytosemedium (1,3 ml) bestand aus FKS-freiem DMEM, das 0,2–1,0 ml einer [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-Lösung enthielt. Nach der Inkubation wurden die Medien gewonnen und die Zellextrakte hergestellt (vergl. 3.5.). Anschließend erfolgte in ihnen die Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen und der Nachweis des Precursors und reifem



**Abb. 18: Endocytose von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-Konzentration**

**A:** HEK 293-Zellen wurden mit 1,3 ml Endocytosemedium, das 0,2–1,0 ml [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q enthielt, 1h bei 37°C inkubiert. Immunpräzipitation der Zellextrakte, SDS-PAGE, Autoradiographie, Phosphoimaging

**B:** Quantitative Auswertung des Autoradiogrammes

- Cathepsin S
- Procathepsin S-N104Q
- ▲—  $\Sigma$  (Procathepsin S, Cathepsin S)

Cathepsin S durch SDS-PAGE und die Quantifizierung durch Phosphoimaging. Abb. 18 zeigt das Autoradiogramm der Abhängigkeit der Endocytose von Procathepsin S-N104Q in Abhängigkeit von der Procathepsin S-N104Q-Konzentration. Es ist ein signifikanter Anstieg sowohl von Procathepsin S-N104Q als auch von reifem Cathepsin S in Abhängigkeit von der Procathepsin S-N104Q-Konzentration in den Zellextrakten nachweisbar. Bereits bei einem Procathepsin-Gehalt von 0,2 ml war Cathepsin S intrazellulär nachweisbar. Aus der quantitativen Auswertung (Abb. 18B) ist eine Tendenz zur Sättigung erkennbar, der eindeutige Nachweis scheiterte daran, dass keine höheren Procathepsin S-N104Q-Konzentrationen eingesetzt werden konnten, weil Versuche zur Konzentrierung von Procathepsin S-N104Q-Medien erfolglos blieben (vergl. 4.2.).

#### **4.4. Endocytose von [<sup>35</sup>S]markiertem Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen an nicht markiertem Procathepsin S-N104Q**

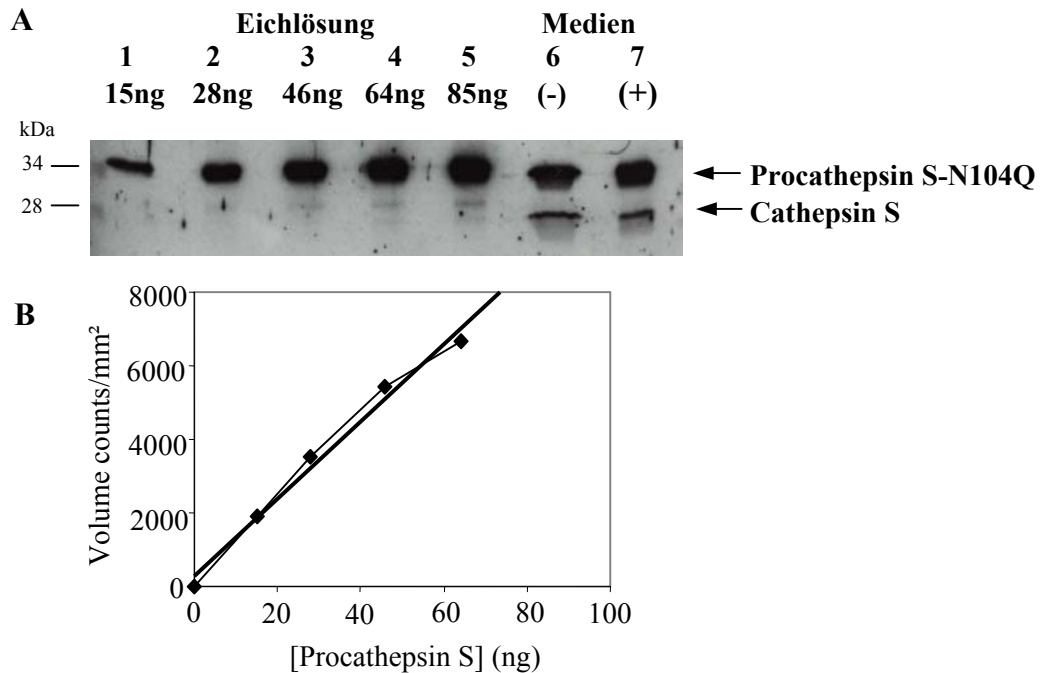
Zum Nachweis der Ausbildung reversibler Komplexe von Procathepsin S-N104Q und einem Bindungsmotiv an der Außenseite der Plasmamembran von HEK 293-Zellen wurden Kompetitionsexperimente von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q und nicht markiertem Procathepsin S-N104Q durchgeführt. Eine Voraussetzung für diese Experimente war die Bestimmung der Konzentrationen von Procathepsin S-N104Q und reifem Cathepsin S in den Endocytoseansätzen. Zur Abschätzung der Enzymkonzentrationen in den Endocytosemedien wurde die Methode der quantitativen Auswertung des ECL-Nachweises von Westernblots durch den Phosphoimager etabliert.

##### **4.4.1. Bestimmung der Procathepsin S-N104Q-Konzentration mit Hilfe des ECL-Systems**

Der Procathepsin S-Gehalt in den Endocytosemedien wurde durch SDS-PAGE und Westernblot, der mit dem ECL-System entwickelt wurde, ermittelt. Die belichteten Autoradiographiefilme wurden eingescannt und die Signale mit dem Phosphoimager ausgewertet.

Zur Abschätzung der jeweiligen Enzymkonzentration und Eichung wurde eine homogene Procathepsin S-Lösung (70 µg/ml) verwendet, welche entsprechend verdünnt wurde. Abb. 19A zeigt, dass die Auswertung des Westernblots mit Hilfe des ECL-Systemes für die Konzentrationsbestimmung geeignet ist. Die Eichkurve (Abb. 19B) ist jedoch nur unter den gewählten Bedingungen in einem engen Konzentrationsbereich von 15 – 85 ng Procathepsin S linear, so dass die Proteinlösungen unbekannter Konzentrationen entsprechend verdünnt werden mussten, um ihre Signale in den Bereich der Eichkurve zu bringen.





**Abb. 19: Bestimmung der Procathepsin S-N104Q-Konzentration mit Hilfe des ECL-Systems**  
 SDS-PAGE und Westernblot von gereinigtem Wildtyp-Procathepsin S (15-85 ng) und Procathepsin S-N104Q von Endocytosemedien, Detektion mit dem ECL-System.

**A:** Entwickelter Autoradiographie-Film des ECL-Nachweises

Bahn 1-5: Procathepsin S (Wildtyp)-Eichlösung (15 – 85 ng)

Bahn 6,7: Medien eines Konkurrenzexperimentes

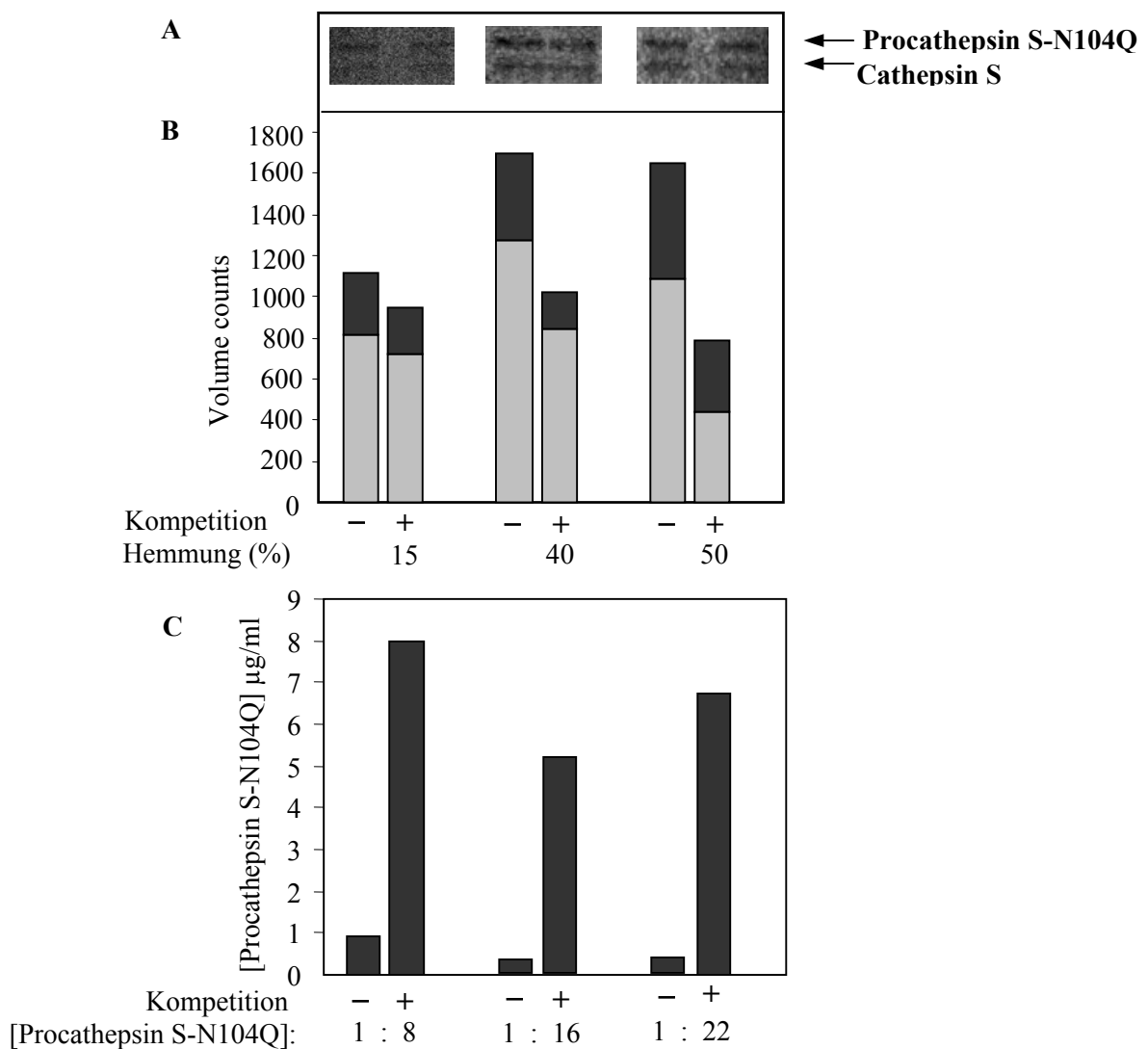
(-) [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q

(+) [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q + gereinigtes Procathepsin S-N104Q

**B:** Quantitative Auswertung der Procathepsin S-Eichlösung durch Einscannen des Autoradiographie-Filmes und anschließende Auswertung durch den Phosphoimager.

#### 4.4.2. Konkurrenzuntersuchungen von [ $^{35}\text{S}$ ]markiertem und nicht markiertem Procathepsin S-N104Q um die Bindung an ein Membranmotiv

Naive HEK 293-Zellen wurden mit einem [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-haltigen Endocytosemedium 1h bei 37°C inkubiert. Die [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q-Endkonzentration betrug zwischen 0,3-0,9  $\mu\text{g/ml}$ . In den Ansätzen wurde den Endocytosemedien entweder 0,5 ml Puffer A (Kontrolle) oder nicht markiertes, gereinigtes Procathepsin S-N104Q (vergl. 4.1.) mit einer Endkonzentration von 6 – 9  $\mu\text{g/ml}$  (Konkpetition) zugesetzt. Im Vorfeld wurde geprüft, ob Puffer A einen negativen Effekt auf die Bindung und Endocytose von Procathepsin S ausübt, dies konnte ausgeschlossen werden. Nach Inkubation wurden die Medien gewonnen und die Zellextrakte hergestellt. Es folgte die Immunpräzipitation von Procathepsin S-N104Q aus den Zellextrakten und die Quantifizierung und Identifizierung nach SDS-PAGE durch Phosphoimaging. Abb. 20A zeigt die Autoradiogramme der elektrophoretisch aufgetrennten Immunpräzipitate der Zellextrakte von drei Konkurrenzexperimenten. In den Extrakten sind sowohl im Konkurrenzansatz als auch im



**Abb. 20** **Kompetition von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q und Procathepsin S-N104Q bei der Endocytose in HEK 293-Zellen.**

HEK 293-Zellen wurden mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q-haltigem Medium unter Zusatz von nicht markiertem Procathepsin S-N104Q (+) bzw. Puffer A (-) (Kontrolle) 1h bei 37°C inkubiert. Gewinnung der Medien, Herstellung der Zellextrakte, Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen aus den Zellextrakten. SDS-PAGE, Phosphoimaging. SDS-PAGE und Westernblot der Medien nach Abschluss der Endocytoseexperimente, Detektion/Quantifizierung mit dem ECL-System wie in Abb. 19 beschrieben.

**A:** Zellextrakte: Autoradiogramm der Immunpräzipitate

**B:** Zellextrakte: Bestimmung von Procathepsin S-N104Q und reifem Cathepsin S  
Berechnung des Ausmaßes der Hemmung der Endocytose von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q aus der Summe von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q und reifem Cathepsin S in %. Die Angabe erfolgt auf der Basis, dass reifes Cathepsin S aus dem Medium nicht endocytiert wird (vergl. 4.5.)

**C:** Medien: Procathepsin S-N104Q-Konzentration nach Inkubation von einer Stunde. Angabe des Verhältnisses der Procathepsin S-N104Q-Konzentrationen zwischen den Kontroll- und Kompetitionsansätzen.

- [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q (Kontrolle)

+ [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q und Procathepsin S-N104Q (Kompetition)

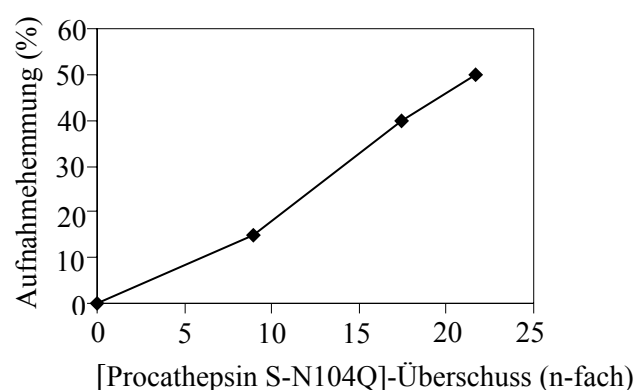
■ Procathepsin S-N104Q

□ reifes Cathepsin S

Kontrollexperiment Procathepsin S-N104Q und reifes Cathepsin S vorhanden, die das Ergebnis der Membranbindung und Endocytose von Procathepsin S-N104Q sowie der intralysosomalen Prozessierung des Precursors zu reifem Cathepsin S sind. Abb. 20B gibt die quantitative Auswertung der einzelnen Banden wieder. Für jedes Konkurrenzexperiment (+) sind neben dem Kontrollexperiment (–) die intrazellulären Summen der Mengen an Procathepsin S-N104Q und reifem Cathepsin S dargestellt. Es wird deutlich, dass der Gehalt an [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q in den Zellextrakten der Endocytoseexperimente in Gegenwart hoher Konzentrationen von gereinigtem Procathepsin S-N104Q niedriger war als im Kontrollansatz, bei dem anstelle des Procathepsin S-N104Q Puffer A zugesetzt worden war. Abb. 20C zeigt die mit dem ECL-System bestimmten Konzentrationen an Procathepsin S ([ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q + Procathepsin S-N104Q/Puffer A) in den zur Endocytose eingesetzten Medien nach Abschluss der Experimente. Der Überschuss an nicht markiertem Procathepsin S-N104Q gegenüber [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q variiert in den drei Experimenten zwischen 8-22 : 1 (Abb. 20C)

In Abb. 21 ist die Abhängigkeit des Ausmaßes der Hemmung der Endocytose von [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q (in %) von dem Verhältnis von nicht markiertem zu markiertem Procathepsin S-N104Q im Medium dargestellt. Sie beweist die Existenz kompetitiver Bindungsverhältnisse: mit steigender Procathepsin S-N104Q-Konzentration im Endocytosemedium sinkt die intrazelluläre Konzentration an radioaktiv markiertem Procathepsin S-N104Q. Die Hemmung der Endocytose ist nur in Abhängigkeit von der Procathepsin S-N104Q-Konzentration dargestellt, obwohl sich auch reifes Cathepsin S im Endocytosemedium befindet (Abb. 19)

Der Nachweis der Konkurrenz bedeutet, dass in der Plasmamembran ein Protein mit einem Bindungsmotiv für nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q vorhanden sein muss.



**Abb. 21** Darstellung der in Abb. 20 bestimmten Hemmungen der Aufnahme von [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q (%) durch steigende Mengen an zugesetztem Procathepsin S-N104Q. Die [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q-Konzentrationen in den Kontrollansätzen wurde auf 1 normiert.

#### 4.5. Endocytose von reifem Cathepsin S

Zur Einengung der Lokalisation des hypothetischen Membranbindungsmotives im Procathepsin S-Molekül wurde untersucht, ob neben Procathepsin S auch reifes Cathepsin S von HEK 293-Zellen gebunden und endocytotiert wird.

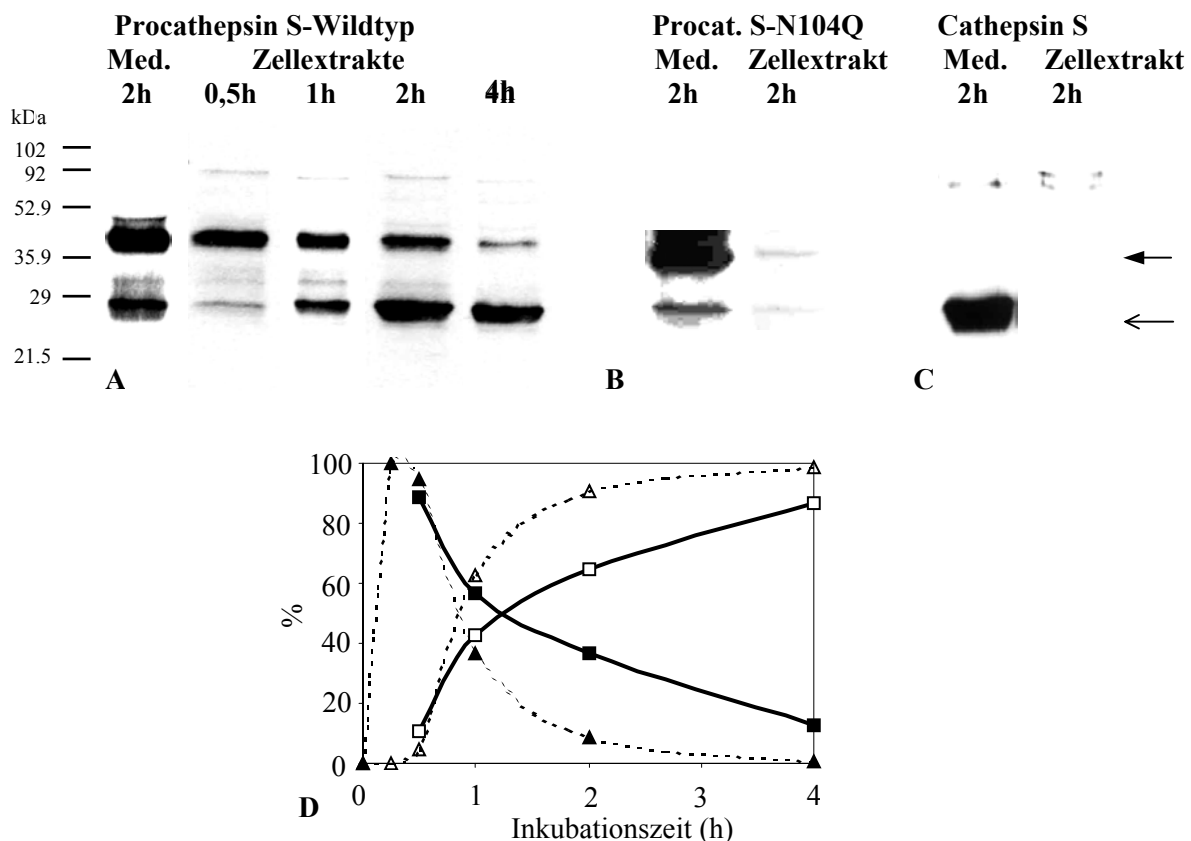
HEK 293-Zellen wurden mit gereinigtem, rekombinanten Cathepsin S inkubiert. Zur Markierung war das Enzym mit dem AMERSHAM Biotinylierungs-Kits biotinyliert und gereinigt worden (vergl. 3.4.2.2.). Um zu prüfen, ob die Biotinylierung des Enzymes die Endocytose beeinflusst, wurden zur Kontrolle Endocytoseexperimente von biotinyliertem Procathepsin S-Wildtyp und biotinyliertem Procathepsin S-N104Q mitgeführt. Hierzu wurde Procathepsin S-Wildtyp und Procathepsin S-N104Q verwendet, welche aus den entsprechenden Transfektanten gewonnen worden waren. Die konzentrierten Procathepsin S-haltigen Medien wurden mit demselben Verfahren biotinyliert und anschließend durch Gelfiltration (Superdex G75 HiLoad 26/60) gereinigt (vergl. 3.4.2.1.). Bei der Markierung des Enzymes einschließlich Konzentrierungs- und Reinigungsprozeduren tritt eine in vitro-Prozessierung auf, die sich nicht unterdrücken ließ. Der Gehalt an reifem Cathepsin S in dem markierten gereinigten Procathepsin S-Wildtyp-Präparat betrug ca. 40%. Durch Westernblots und Immunpräzipitation der Fraktionen der chromatographischen Reinigung konnte zunächst bewiesen werden, dass mit dem Anti-Cathepsin S-Antikörper auch biotinyliertes Procathepsin S und reifes Cathepsin S nachgewiesen werden kann. Zur Untersuchung der Endocytose von biotinyliertem Cathepsin S und biotinyliertem Procathepsin S wurde den Medien naiver konfluenter HEK 293-Zellen die genannten Cathepsin S-Präparate zugesetzt. Nach Inkubationszeiten von 0,5-2 h (Procathepsin S-Wildtyp) bzw. 2 h (Cathepsin S, Procathepsin S-N104Q) bei 37°C wurden die Medien gewonnen und die Zellextrakte hergestellt (vergl. 3.5.).

Anschließend wurden die Cathepsin S Formen aus den Zellextrakten und Medien immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch ECL-Entwicklung der Westernblots identifiziert und quantifiziert. Die Immunpräzipitation der Procathepsin S-Formen aus den Endocytosemedien nach Beendigung der Inkubation mit den Zellen zeigte, dass während des Endocytoseexperimentes die Enzyme keine nennenswerten Veränderungen erfahren haben.

Im Endocytoseexperiment mit biotinyliertem Procathepsin S-Wildtyp (Abb. 22A) wurde nach einer Inkubationszeit von 0,5 h hauptsächlich Procathepsin S im Zellextrakt nachgewiesen.

Das Verhältnis von Procathepsin S zu reifem Cathepsin S betrug 88:11. Innerhalb der folgenden zwei Stunden nahm der prozentuale Anteil von reifem Cathepsin S in den

Zellextrakten deutlich zu. Nach 2 Stunden kehrte sich das Verhältnis zwischen Procathepsin S und Cathepsin S zu Gunsten des reifen Cathepsin S (35:65) um. In die Darstellung der quantitativen Auswertung der Endocytose von biotinyliertem Procathepsin S-Wildtyp (Abb. 22D) ist auch die der Endocytose von [ $^{35}$ S]Procathepsin S-Wildtyp des in Abb. 16C dargestellten Experimentes eingetragen. Der nahezu gleiche Verlauf der Aufnahme beider markierter Proenzyme und des aus ihnen entstandenen reifen Cathepsins beweist, dass die Biotinylierung von Procathepsin S keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindung, Endocytose und Prozessierung in HEK 293-Zellen hat.



**Abb. 22: Endocytose von biotinyliertem Procathepsin S und reifem Cathepsin S**

**A:** Inkubation von HEK 293 Zellen mit gereinigtem, biotinyliertem Procathepsin S-Wildtyp, 0,5-4h bei 37°C

**B:** Inkubation von HEK 293-Zellen mit biotinyliertem Procathepsin S-N104Q, 2h bei 37°C

**C:** Inkubation von HEK 293-Zellen mit biotinyliertem Cathepsin S, 2h bei 37°C.

Gewinnung der Medien und Zellextrakte, Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen, SDS-PAGE, Blotting, ECL-Auswertung (vergl. 3.5., 3.6., 3.8.)

← Procathepsin S, ← Cathepsin S

**D:** Quantitative Auswertung der Endocytose von biotinyliertem Procathepsin S-Wildtyp in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Vergleich zu [ $^{35}$ S]Procathepsin S-Wildtyp (vergl. Ergebnisse 4.3.2.). Dargestellt als Prozentuales Verhältnis zwischen aufgenommenen Procathepsin S und intrazellulär prozessiertem Cathepsin S.

- ▲- [ $^{35}$ S]Procathepsin S-Wildtyp
- △- [ $^{35}$ S]Cathepsin S
- biotinyliertes Procathepsin S-Wildtyp
- biotinyliertes Cathepsin S

Im Gegensatz zur Endocytose von Procathepsin S war nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen mit Cathepsin S-haltigem Medium bei identischer Probenaufbereitung keine Cathepsin S-Bande in der ECL-Auswertung sichtbar (Abb. 22C). Ein vorzeitiger hetero- oder autokatalytischer Abbau des Enzyms ist nahezu ausgeschlossen, da den Medien der Proteaseinhibitor E64 zugesetzt worden war. Das in den Zellextrakten nicht nachweisbare Cathepsin S beweist, dass reifes Cathepsin S im Gegensatz zu Procathepsin S, nicht von den Zellen aufgenommen wird und stützt die Hypothese, dass für die Aufnahme von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q die Propeptidregion verantwortlich ist. Dieses Ergebnis untermauert außerdem die These, dass die Aufnahme von Procathepsin S-N104Q rezeptorvermittelt ist und nicht durch „fluid phase Endocytose“ erfolgt.

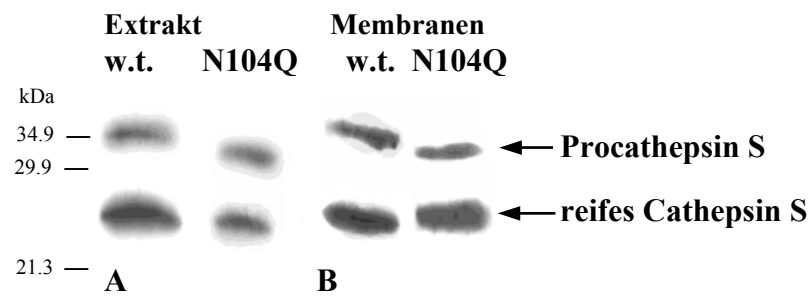
#### **4.6. Nachweis von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q in Lysosomen von HEK 293-Zellen**

Im folgenden wurde der Nachweis von Procathepsin S-N104Q in den Lysosomen im Vergleich zu Wildtyp-Procathepsin S erbracht. Aus HEK 293- Zellen, die Wildtyp- bzw. nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren, wurden Lysosomen präpariert (Ciechanover und Wiederanders, 1999): von den Zellhomogenaten wurde postnucleärer Überstand hergestellt, aus dem die Lysosomen durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Die gewaschenen Lysosomen wurden in hypotonem Medium in Gegenwart von Proteaseinhibitoren ohne Detergens im POTTER-Homogenisator aufgeschlossen und das Lysosomenhomogenat zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstandes, bei dem es sich um den Lysosomenextrakt handelt, wurde das Membranpellet in PBS suspendiert. Die Unversehrtheit der gewaschenen Lysosomen und die Effektivität der Öffnung der Lysosomen wurde durch Bestimmung der Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase in der Waschflüssigkeit bzw. im Lysosomenextrakt überprüft (Tab. 3). Die im Lysosomenextrakt gemessene  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt. Demgegenüber betrug der Gehalt des lysosomalen Leitenzyms im Medium vor Öffnung der Lysosomen 2 %.

**Tab. 3 Verteilung der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität in der Lysosomen-Suspension**

$\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität	mU/ml	%
Waschwasser	0.16	2
Lysosomenextrakt	8.0	100

Die Cathepsin S-Formen der Lysosomenextrakte und der Membranfraktionen wurden immunpräzipitiert und im Westernblot mit dem ECL-System nachgewiesen (Abb. 23).



**Abb. 23: Immunoblot-Analyse der isolierter Lysosomen von HEK 293-Zellen, die glykosyliertes und nicht-glykosyliertes Procathepsin S exprimieren**

**A:** Lysosomenextrakt

**B:** Lysosomenmembran-Präparation

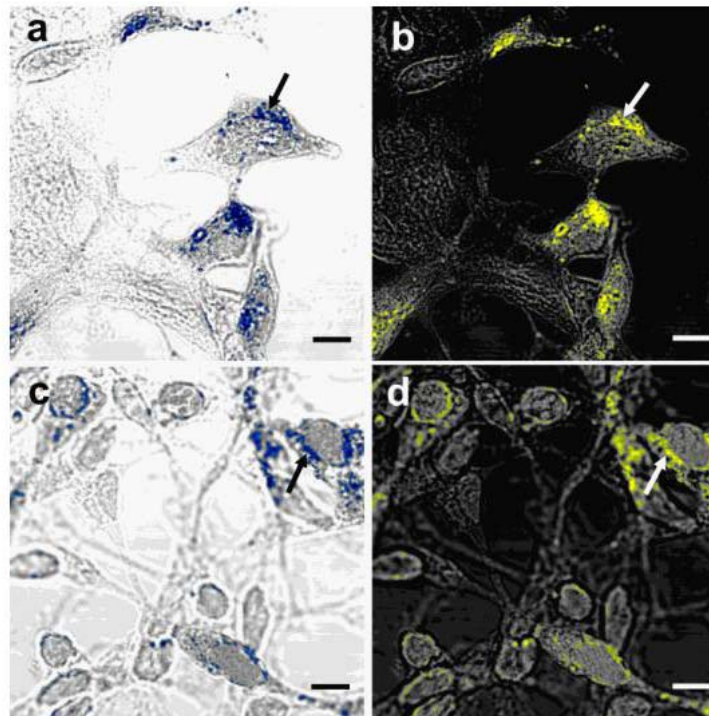
w.t.- Procathepsin S-Wildtyp

Der Lysosomenextrakt beider Transfektanten enthält sowohl Procathepsin S als auch reifes Cathepsin S (Abb. 23A). In den Präparationen von lysosomalen Membranen von HEK 293-Zellen, die Wildtyp- bzw. nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren, war bei beiden Präparationen neben Procathepsin S auch reifes Cathepsin S nachweisbar (Abb. 23B). Damit wurde bewiesen, dass neben Wildtyp-Procathepsin S auch nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q die Lysosomen erreicht hat und dort zu reifem Cathepsin S prozessiert wird.

#### **4.7. Ultrastrukturelle Untersuchung der subzellulären Verteilung von glykosyliertem und nicht glykosyliertem Procathepsin S in HEK 293 Zellen**

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurde mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie der immunhistochemische Nachweis sowohl von Procathepsin S-Wildtyp als auch von nicht glykosyliertem Procathepsin S-N104Q in den transfizierten HEK 293 Zellen erbracht (Abb. 24). In den Zellen, die Procathepsin S-Wildtyp exprimieren, sind Cathepsin-spezifische Signale in cytoplasmatischen Granula erkennbar (Abb. 24a, b); entsprechende Signale des nicht glykosylierten Enzyms sind ebenfalls im Zytoplasma, aber vorwiegend in Kernnähe, lokalisierbar (Abb. 24c, d).

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Zellen, die Procathepsin S-Wildtyp exprimieren, werden intensive Cathepsin S-spezifische Immunpräzipitate in Vesikeln nachgewiesen, bei denen es sich um Lysosomen handeln könnte (Abb. 25a). Außerdem sind signifikante Mengen an Immunpräzipitat in der Plasmamembran sichtbar. Teilweise lassen sich sogar endocytotische Invaginationen und Vakuolen erkennen, die Cathepsin S-spezifische Signale enthalten (Abb. 25 b).



**Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis von Procathepsin S und Procathepsin S-N104Q in den entsprechenden HEK 293-Zelltransfektanten mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie** (Nissler et al., 2002)

Die auf coverslips gewachsenen Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit dem polyclonalen Anti-Cathepsin S-Antikörper behandelt. Die Immunkomplexe wurden mit dem sekundären Antikörper Anti-Kaninchen IgG-Cys2<sup>TM</sup>-Konjugat entwickelt. Laser scanning Mikroskopie mit dem LSM 310 (Carl Zeiss, Oberkochen-Jena) bei 488 nm. Balken 5 µm.

Differentieller Interferenzkontrast (a, c), Fluoreszenzmodus, Farbcodierung (b, d)

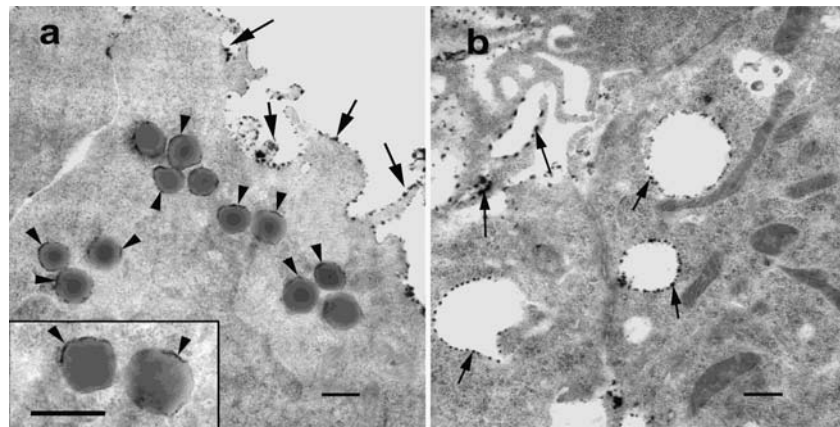
a, b: Procathepsin S-Wildtyp,

c, d: nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q.

In HEK 293-Zellen, die nicht-glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren, sind ebenfalls Cathepsin-spezifische Immunpräzipitate nachweisbar, die im Gegensatz zu denen von Procathepsin S-Wildtyp exprimierender Zellen diffus im gesamten Zytoplasma verteilt sind. Abb. 26a lässt erkennen, dass die Immunpräzipitate ebenfalls in Vesikeln lokalisiert sind. Die Mehrzahl der Lysosomen ist frei von Immunpräzipitaten; jedoch sind in einigen Lysosomen vereinzelt schwache Signale nachweisbar, die vorzugsweise an der inneren Lysosomenmembran lokalisiert sind (Abb. 26b). Signifikante Mengen an Immunpräzipitat werden am äußeren Blatt der Plasmamembran nachgewiesen. Sie sind mit denen vergleichbar, die an Zellen beobachtet wurden, die Wildtyp-Procathepsin S exprimieren. Da der primäre Antikörper Procathepsin S, reifes Cathepsin S und das abgespaltene Propeptid nachweist, sind sie mit dieser Methode nicht zu unterscheiden. Um welche Cathepsin S-Formen es sich



handelt, wurde in Kapitel 4.6. bewiesen. Naive HEK 293-Zellen enthalten überhaupt kein Immunpräzipitat (nicht gezeigt).



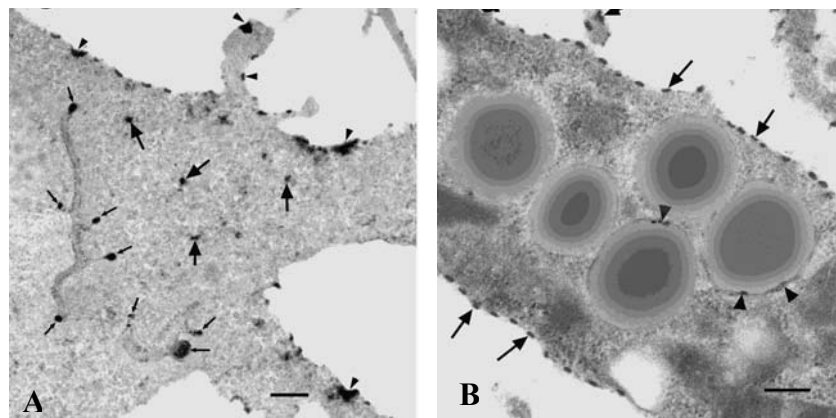
**Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-Wildtyp exprimieren**

Die Zellen wurden nach Paraformaldehyd-Fixierung mit dem primären Anti-Cathepsin S-Antikörper und anschließend mit dem sekundären Anti-Kaninchen IgG (Ziege) behandelt. Die Immunreaktion wurde mit Hilfe von Anti-Ziege Peroxydase-Antiperoxydase-Komplex (Kaninchen) vervollständigt und mit Ni-DAB (Halbhuber et al. 1994, 1996) sichtbar gemacht. Nach Postfixierung mit  $\text{OsO}_4$  und Einbettung (Epon-812) wurden ultradünne Schnitte hergestellt und mit dem ZEISS EM 906 mikroskopiert.

a: Lokalisation von Immunpräzipitaten in Lysosomen (▲) und Lysosomen-Membranen (↑) (Inset) sowie an der Plasmamembran (↑)

b: Nachweis spezifischer Ni-DAB-Präzipitate an endocytotischen Vakuolen

Balken  $0.5 \mu\text{m}$



**Abb. 26: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HEK 293-Zellen, die nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren**

**A:** Procathepsin S-Immunpräzipitate in zytoplasmatischen Vesikeln (▲), die vom endoplasmatischen Retikulum abknospen (↑)

**B:** Immunpräzipitate an Lysosomenmembran (▲) und Plasmamembran (↑)

Methodik vgl. Abb. 25. Balken  $0.25 \mu\text{m}$

#### **4.8. Untersuchungen zur Bindung von [<sup>35</sup>S]markiertem Procathepsin S-N104Q an Membranen von HEK 293-Zellen**

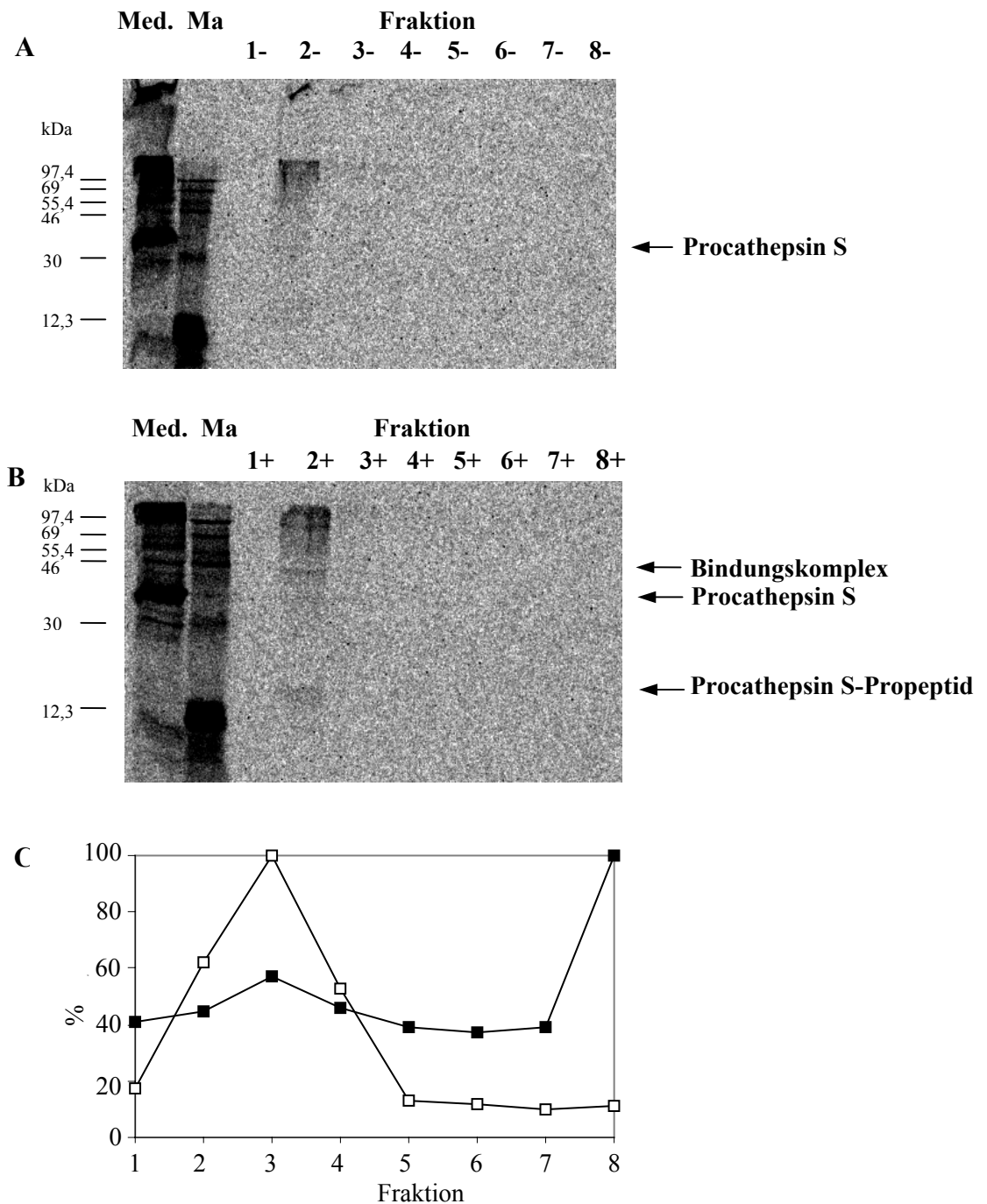
Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Endocytose von Procathepsin S-N104Q machen eine Mannose-6-Phosphat-unabhängige Aufnahme des Precursors durch HEK 293-Zellen wahrscheinlich. Als Hypothese wird ein Membranbindungsprotein postuliert, welches Procathepsin S Mannose-6-Phosphat-unabhängig bindet und den Eintransport vermittelt. Ziel der folgenden Untersuchungen ist der Nachweis dieses hypothetischen Membranbindungsproteines.

Hierzu wurden folgende Experimente orientierend durchgeführt. Es wurden Membranen unbehandelter HEK 293-Zellen nach Potter-Homogenisation durch Ultrazentrifugation gewonnen und in Puffer aufgenommen, der keine Detergensen und reduzierende Agenzien enthielt. Die Membranpräparation wurde auf eine Blotmembran (Hybond-Membran) pipettiert (Dot-Blot). Nach Blockierung mit Lactalbumin wurde der Blot mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q überschichtet (45 min, 25°C) und nachfolgend mit PBS exzessiv gewaschen. Die Autoradiographie der Membran erbrachte einen deutlichen Nachweis von gebundenen Procathepsin S im Dot-Blot. Auf Grundlage dieses Befundes wurde daraufhin versucht, die Membranfraktionen elektrophoretisch aufzutrennen und eine Procathepsin S-bindende Fraktion mit Hilfe der Overlay-Technik unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q nachzuweisen. Diese Versuche waren erfolglos, obwohl nach einer Silberfärbung sowie nach Färbung der Blotmembran mit Ponceau-Rot zahlreiche Membranproteine nachweisbar waren. Das Autoradiogramm der SDS-PAGE von Membranfraktionen naiver, unbehandelter HEK 293-Zellen, die zuvor mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q inkubiert worden waren, ergaben ebenfalls keinen Nachweis eines Membranbindungsproteines für nicht glycosyliertes Procathepsin S.

Da keine Informationen über die Natur und Stärke der Bindung zwischen dem Enzym und dem hypothetischen Bindungsproteines in der Membran vorliegen, kann es sein, dass die Stabilität des Procathepsin S-Membranprotein-Komplexes so gering ist, dass er die nachfolgenden Aufarbeitungsprozeduren nicht übersteht und sich somit dem Nachweis durch die gewählte Methode entzieht. Aus diesem Grund wurde versucht, den Enzym-Membranprotein-Komplex durch Einsatz eines Crosslinkers zu stabilisieren. Verwendet wurde der homobifunktionelle, wasserlösliche, nicht membrangängige Crosslinker 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidyl-propionat] (DTSSP), der für Untersuchungen zur Konjugierung radioaktiv markierter Liganden an Zelloberflächenrezeptoren besonders geeignet ist. Die beiden funktionellen Reste des Crosslinkers sind durch eine Disulfidbindung miteinander

verknüpft, welche durch Reduktionsmittel gespalten werden kann. Damit kann der Protein-Rezeptor-Komplex nach seiner Isolierung getrennt und die Bindungspartner der weiteren Analytik zugeführt werden (vergl. 3.7.,3.8).

Nach der Behandlung mit dem Crosslinker wurden die Zellen intensiv gewaschen und aufgeschlossen um den postnucleären Überstand zu gewinnen, der einer Percoll-Gradienten-Zentrifugation unterzogen wurde. Anschließend wurden die gebildeten Procathepsin S-N104Q-Membranprotein-Komplexe aus den subzellulären Fraktionen durch Immunpräzipitation gewonnen. Abb. 27 demonstriert die Ergebnisse eines Bindungsexperimentes von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q an naive HEK 293-Zellen unter Verwendung des Crosslinkers DTSSP, Abb. 27A zeigt das Autoradiogramm des Elektropherogrammes der Cathepsin S-Immunpräzipitate der Fraktionen 1-8 der Percoll-Gradienten-Zentrifugation, die mit Elektrophoreseprobenpuffer gekocht wurden, der SDS aber keine Mercaptoethanol enthielt. Lediglich in Fraktion 2 ist ein radioaktiv markiertes immunpräzipitiertes Protein zu erkennen, das sich im Gegensatz zum Procathepsin S des Mediums im hochmolekularen Bereich befindet. Wir postulieren, dass es sich um einen Komplex von Procathepsin S-N104Q und einem Membranprotein handelt. Weiter unterhalb wird in dieser Fraktion eine Bande schwach sichtbar, die dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit wie freies Procathepsin S aufweist. Abb. 27B zeigt das Autoradiogramm derselben Fraktionen mit dem Unterschied, dass die Immunpräzipitate mit mercaptoethanolhaltigen Elektrophoreseprobenpuffer behandelt wurden. Auch in dieser Abbildung ist Protein ausschließlich in Fraktion 2 nachweisbar. Neben den wie in Abb. 27A nachgewiesenen hochmolekularen Cathepsin S-Verbindungen kommen jedoch 3 weitere Banden zur Darstellung. Die in Abb. 27A schwach sichtbare Bande, die dem Molekulargewicht von freiem [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q entspricht, ist in der Fraktion 2 der Abb. 27B wesentlich stärker ausgeprägt. Oberhalb dieser Bande kommt im Bereich von etwa 46 kDa eine intensive Bande zur Geltung, die in Abb. 27A nicht nachweisbar war. Weiterhin ist im niedrigmolekularen Bereich von etwa 12 kDa eine dritte Bande sichtbar, die ebenfalls in der Fraktion 2 der Abb. 27A nicht vorhanden war. Das verstärkte Auftreten von Procathepsin S im Bereich von 35 kDa nach Mercaptoethanolzusatz wird damit erklärt, dass der Crosslinking-Komplex von nicht glycosyliertem [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q-DTSSP-Membranprotein gespalten wird. Dadurch wird das gebundene Enzym freigesetzt und erscheint bei der elektrophoretischen Auftrennung an der Position von unbehandelten Procathepsin S-N104Q. Bei der ebenfalls nur nach Mercaptoethanol-Behandlung nachweisbaren, niedrigmolekularen Bande kann es sich höchstwahrscheinlich um das Procathepsin S-Propeptid handeln. Die Cathepsin S-spezifische



**Abb. 27: Bindung von [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q an intakte HEK 293-Zellen in Gegenwart des Crosslinkers DTSSP.**

Inkubation naiver HEK 293-Zellen mit [ $^{35}\text{S}$ ]Procathepsin S-N104Q 37°C, 2h. Nach Abtrennung des Mediums Überschichtung mit 3 ml einer DTSSP-Lösung, 1,6 mM in PBS, 20°C, 1h. Herstellung des postnucleären Überstandes Percoll-Gradienten-Zentrifugation, Fraktionierung in 8 Fraktionen zu je 500µl, Fraktion 1: oberste Fraktion, Fraktion 8: Bodenfraktion, Abtrennung des Percolls durch Zentrifugation, Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen in jeder Fraktion, Inkubation der Immunpräzipitate mit Probenpuffer ohne (A) und mit (B) Mercaptoethanol 100°C, 5 min, SDS-PAGE, Phosphoimaging

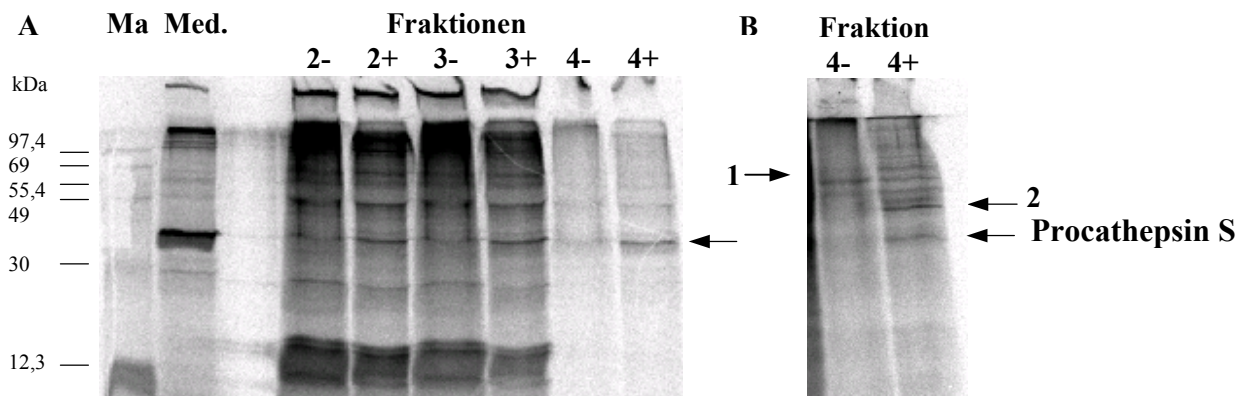
**A:** SDS-PAGE der Immunpräzipitate ohne Mercaptoethanol

**B:** SDS-PAGE der Immunpräzipitate mit Mercaptoethanol

**C:** Aktivität von β-Hexosaminidase (—■—) und PI-Kinase (—□—) in den Fraktionen

Bande im Bereich von 46 kDa ist möglicherweise das Produkt einer unvollständigen Spaltung des Crosslinking-Komplexes. Die Experimente werden dahingehend interpretiert, dass nicht glycosyliertes [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q nach Zusatz zu naiven HEK 293-Zellen an ein Membranprotein bindet, welches nicht der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor ist. Abb. 27C dient der Identifizierung der subzellulären Kompartimente. Die Bestimmung der  $\beta$ -Hexosaminidase in den Fraktionen zeigte die Position der Lysosomen in Fraktion 8 und die der membranständigen Phosphatidyl-Inositol-Kinase die Lokalisation der Membranen in den Fraktionen 2-4 an.

Im folgenden wurde versucht, das Membranbindungsprotein für Procathepsin S-N104Q, welches in Abb. 27 angezeigt wird, durch Vitalmarkierung der Zellen zur Darstellung zu bringen. Hierzu wurden HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q exprimieren mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiert. Diese Zellen sezernieren Procathepsin S-N104Q in großen Mengen in das Kulturmedium und endocytieren es gleichzeitig aus ihm (Nissler et al., 1998); vergl. Bahn 2 in Abb. 28A. Der dabei gebildete Komplex von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q und dem entsprechenden [<sup>35</sup>S]markiertem Membranbindungsprotein wurde mit dem Crosslinker DTSSP stabilisiert. Nach subzellulärer Fraktionierung und Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen aus den Membranfraktionen wurde der Crosslinker in den entsprechenden Ansätzen durch Mercaptoethanol gespalten, um die Bindungspartner darzustellen (vergl. 3.10.). Abb. 28A zeigt das Autoradiogramm eines Bindungsexperimentes von vitalmarkierten HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q exprimieren. Die Analyse der Fraktionen 2-4 der Percoll-Gradienten-Zentrifugation, welche die Membranproteine enthalten, ließen auf der Position des Procathepsin S nach Spaltung des DTSSP durch Mercaptoethanol ((+)-Fraktionen) intensive Banden erkennen, die in den Fraktionen ohne Mercaptoethanol-Behandlung ((-)-Fraktionen) nur in geringen Maße vorhanden sind. Durch Spaltung des DTSSP wurde das Procathepsin S-N104Q aus einem Komplex von Procathepsin S-N104Q und Membranprotein freigesetzt. Damit wird das Ergebnis von Experiment 27 bestätigt. Während in Abb. 27 die Procathepsin S-Bande nur in Fraktion 2 sichtbar war, kommen sie in diesem Experiment auch in den Fraktionen 3 und 4 vor, jedoch mit dem Maximum in Fraktion 2. Nach Spaltung des Komplexes mit Mercaptoethanol wird die Bande von 46 kDa verstärkt, die auch in Abb. 27 zur Darstellung kam. Sie ist nicht mit der Fremdprotein-Bande des Mediums in diesen Molekularbereich identisch, da diese größer als 46 kDa ist. In einem analogen Experiment, das auszugsweise in Abb. 28B dargestellt ist, ist zu sehen, dass bei Mercaptoethanol-Behandlung neben der Bande von ca. 35 kDa, die dem



**Abb. 28: Bindung von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q an intakte, [<sup>35</sup>S]vitalmarkierte HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q exprimieren, in Gegenwart des Crosslinkers DTSSP.**

**A:** Vitalmarkierung von HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q exprimieren, mit [<sup>35</sup>S]Methionin 18 h bei 37°C, 7,5 % CO<sub>2</sub>. Abtrennung des Mediums und Überschichtung mit 3 ml PBS, 1,6 mM DTSSP; 1h, 20°C. Herstellung des postnucleären Überstandes, Percoll-Gradienten-Zentrifugation, Fraktionierung in 8 Fraktionen zu je 500µl, Fraktion 1: oberste Fraktion, Fraktion 8: Bodenfraktion, Abtrennung des Percolls durch Zentrifugation, Immunpräzipitation der Cathepsin S-Formen in den Fraktionen 2-4, Inkubation der Immunpräzipitate mit Probenpuffer ohne (-) und mit (+) Mercaptoethanol 100°C, 5 min, SDS-PAGE, Phosphoimaging.

**B:** Analoges Experiment wie unter A beschrieben, Ausschnitt Fraktion 4 ohne (-) und mit (+) Mercaptoethanol

Procathepsin S-N104Q entspricht, zahlreiche Banden im Molmassen-Bereich zwischen 50–100 kDa auftreten, die im Ansatz ohne Mercaptoethanol nicht vorhanden sind. Weiterführende Experimente müssen zeigen, aus welchem Protein das hypothetischen Membranbindungsproteines hervorgeht.

## 5. Diskussion

### 5.1. Untersuchungen zur Bindung von nicht glycosyliertem Procathepsin S an HEK 293-Zellen

Zur Untersuchung der Sortierung lysosomaler Cysteinproteasen wurden HEK 293-Zellen entweder mit der Procathepsin S-Wildtyp cDNA oder mit einer Procathepsin S cDNA transfiziert, bei der die einzige Glycosylierungsstelle N104 im Propeptidanteil mit ortsgerichteter Mutagenese durch Austausch mit Glutamin blockiert worden war. Die HEK 293-Zellen besitzen selbst kein endogenes Cathepsin S, letzteres wird ausschließlich in lymphatischen Geweben und immunkompetenten Zellen, wie z. B. in antigen-präsentierenden Zellen, in Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert (Kirschke et al., 1989, Shi et al., 1993). Die Zellen, die mit der mutierten Procathepsin S-cDNA-N104Q transfiziert waren, exprimieren nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q, welches in der Zelle akkumuliert und im Gegensatz zur Expression des Wildtyp-Procathepsin S nicht reift, sondern in großen Mengen in das Kulturmedium sezerniert wird (vergl. Abb.7).

Neben Procathepsin S-N104Q wurden jedoch in den Zellen auch Spuren von Cathepsin S nachgewiesen, die das Ergebnis der Endocytose des sezernierten Procathepsin S-N104Q sind. Der Nachweis der Bindung des Procathepsin S-N104Q, dem das Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignal fehlt, bei niedrigen Temperaturen sowie die Endocytose bei 37°C weisen auf eine spezifische, Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierung hin (Nissler et al., 1998).

Die Experimente dieser Arbeit zur Untersuchung der Spezifität der Bindung von Procathepsin S-N104Q an HEK 293-Zellen sollten mit einem gereinigten Procathepsin S-Präparat durchgeführt werden. Grundlage für die Reinigung des Enzyms ist ein für die Reinigung von Wildtyp-Procathepsin S, welches mit Hilfe des Baculovirussystem in Insektenzellen (High Five Zellen aus *Trichoplusia ni*) zur Expression gebracht wurde, entwickeltes Verfahren. Mit Hilfe von Con-A-Sepharose-Chromatographie, hydrophober Interaktionschromatographie und Gelfiltration wurde ein homogenes Wildtyp-Procathepsin S im präparativen Maßstab gewonnen.

Ausgangsmaterial für die Reinigung war sezerniertes Procathepsin S-N104Q. Die Con-A-Sepharose-Chromatographie ist bei einem nicht glycosyliertem Präparat nicht durchführbar. Konzentriertes Procathepsin S-N104Q-haltiges Kulturmedium wurde auf eine Phenylsepharose-Chromatographie-Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem Triton X100-Gradienten der Endkonzentration 0,54 %. Die vereinigten Procathepsin S-N 104Q-

haltigen Fraktionen wurden durch wiederholte Druckfiltration mit Triton-freiem Puffer A intensiv umgepuffert. Trotzdem enthielt das Enzym-Präparat noch beträchtliche Mengen an Triton X100 (90 Mol Triton/Mol Procathepsin S-N104Q). Eine anschließend durchgeführte Gelfiltration dieses Präparates führte nicht zur Abtrennung des Triton X100 (vergl. 4.1.2.2.). Für die Entfernung des Tritons X100 eignen sich BioBEADS SM 2 der Firma BIORAD, was an Triton-haltigen wässrigen Albumin-Lösungen bestätigt wurde: Das zugesetzte Triton X100 wurde durch die BioBEADS vollständig entfernt, die Proteinverluste waren gering (Abb. 10-12). Die Abtrennung des Tritons aus konzentrierten, umgepufferten Procathepsin S-N104Q-Säuleneluaten der hydrophoben Interaktionschromatographie gelang jedoch nicht: Der Triton X100-Gehalt wurde nur zu 75 % gesenkt, es kam dabei zu nicht zu tolerierenden Verlusten an Procathepsin S-N104Q, was sowohl durch Messung der Radioaktivität von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q (vergl. 4.1.2.1, Abb. 13) als auch durch die Proteinbestimmung vor und nach Beads-Behandlung (Tab. 1) bestimmt werden konnte.

Ursache dafür sind entweder die Bindung von Procathepsin S-N104Q an die BioBEADS aufgrund der ausgeprägten Hydrophobizität des Propeptidanteils der Mutante bzw. eine so starke Bindung des Tritons an das Enzym, dass bei Entfernung des Tritons auch das Protein mit den BioBEADS entfernt wird.

Um negative Effekte des mitgeführten Tritons im Procathepsin S-N104Q- Präparat bei der Endocytose durch HEK 293-Zellen zu vermeiden, musste auch auf die hydrophobe Interaktionschromatographie verzichtet werden. Die Reinigung von Procathepsin S-N104Q-haltigen Medien bestand daraufhin nur aus einer Gelfiltration mit anschließender Rechromatographie an derselben Gelfiltrationssäule. Der Westernblot und die Silberfärbung eines SDS-PAGE-Geles der enzymhaltigen Fraktionen nach der Chromatographie (Abb. 14) zeigten eine zufriedenstellende Reinheit des Präparates.

Bei der Konzentrierung der enzymhaltigen Fraktionen der Gelfiltration traten hohe Verluste an Procathepsin S-N104Q auf, die nicht verhindert werden konnten. Sie entwickelten sich zu einem Problem bei der Durchführung mehrerer Experimente, insbesondere bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Endocytose sowie bei den Konkurrenzexperimenten von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q mit nicht markiertem Procathepsin S-N104Q, die dadurch in ihrer Aussagefähigkeit eingeschränkt wurden. Sie traten besonders dann auf, wenn hohe Procathepsin S-N104Q-Konzentrationen erforderlich waren, um z. B. in sättigende Bereiche zu gelangen. Ursache für die Verluste ist die Adsorption von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q an die Membranen der Konzentrierungsvorrichtungen, die höchstwahrscheinlich in der gesteigerten Hydrophobizität durch die



fehlende Oligosaccharidseitenkette begründet ist. Der Verlust ist besonders bei gereinigten Enzympräparaten hoch, er beträgt bei der Amicon-Druckfiltration über 60%. Die Verwendung von Einwegkonzentratoren mit verringerter Filtrationsfläche und mit erhöhter Membranhydrophobizität reduzierte den Verlust nicht, im Gegenteil, es wurde die nahezu vollständige Bindung an die Filtrationsmembran gemessen (vergl. Tab. 2). Die Verwendung der SpeedVac-Apparatur (BACHOFER) zur Konzentrierung von gereinigtem Procathepsin S-N104Q, bei der die Verringerung des Volumens im Vakuum ohne jeglichen Einsatz von Membranen erreicht wird, war ebenfalls erfolglos. Auch hierbei kommt es offenbar zu Wechselwirkungen des hydrophoben Proteins mit Gefäßoberflächen, die sich als irreversibel erwiesen. Die Konzentrierung von Procathepsin S-N104Q-haltigen Medien bzw. Säuleneluaten durch Ammoniumsulfat-Präzipitation (80% Sättigung) gelang mit guter Ausbeute, jedoch erlangte das Protein trotz Entfernung des Ammoniumsulfates seine native Form nicht wieder: Endocytoseexperimente waren mit diesem Präparat erfolglos. Aus diesen Gründen ließen sich Lösungen nicht in den gewünschten hohen Konzentrationen herstellen. Dies hatte zur Konsequenz, dass Säuleneluat nicht konzentriert und somit auch nicht verwendet werden konnten und das bei der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Endocytose ein sättigender Bereich nicht erreicht und bei den Konkurrenzexperimenten nicht die maximale Hemmwirkung gemessen werden konnte.

Ein Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war die Charakterisierung der Endocytose von Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen, um zu entscheiden, ob es sich um eine spezifische Aufnahme oder um einen unspezifischen Mechanismus, z.B. „fluid phase“ Endocytose handelt. Die Endocytoseexperimente wurden mit [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q-haltigen Medien [ $^{35}$ S]Methionin-vitalmarkierter HEK 293-Zellen, welche die Mutante exprimieren, durchgeführt.

Abb. 7A zeigt das Autoradiogramm eines Elektropherogrammes von [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q-haltigem Medium, aus dem erkennbar wird, dass Procathepsin S-N104Q im Medium akkumuliert und nicht reift. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Sekretion überein (Nissler et al., 1999). In Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen insbesondere aber nach Reinigungs- und Konzentrierungsprozeduren sowie bei der Entfernung des Tritons aus den Enzympräparaten ist trotz Zusatz von Proteasehemmstoffen wie PMSF, JAA, E64, EDTA reifes Cathepsin S in unterschiedlichem Ausmaß neben Procathepsin S als Ergebnis einer in vitro-Prozessierung nachweisbar (Abb. 13, 19, 22) (Mason und Massey, 1992). Die Abb. 7A zeigt weiterhin, dass durch Zusatz von Ammoniumchlorid die Ausbeute an Procathepsin S-N104Q nicht gesteigert werden kann,

während das bei der Expression von Wildtyp-Procathepsin S der Fall ist (Abb. 7B). Ammoniumchlorid führt zu einer Erhöhung des intralysosomalen pH-Wertes, wodurch Wildtyp-Procathepsin S nur in geringerem Ausmaße prozessiert und verstärkt sezerniert wird (Ohkuma et al., 1978, Tanaka et al., 2000). Die Tatsache, dass Procathepsin S-N104Q durch Ammoniumchlorid nicht verstärkt sezerniert wird, ist ein wichtiger Hinweis für eine Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierung (Capony et al., 1994).

Nissler et al. (1998) wiesen die Endocytose und intralysosomale Prozessierung von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q nach einer Inkubationszeit von 17h bei 37°C nach. Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis der Endocytose nach 8h (Abb. 15) weist auf eine Zeitabhängigkeit der Endocytose hin, die im folgenden im Vergleich zu der des Wildtyp-Procathepsin S analysiert wurde.

Bei dem Endocytoseexperiment mit Wildtyp-Procathepsin S (Abb. 16) ist bereits nach 15 min Procathepsin S in den Zellen nachweisbar und es dauert ca. 1h, bis der Precursor das Lysosomen erreicht, was durch Auftreten von reifem Cathepsin S angezeigt wird. Die Procathepsin S-Konzentration steigt weiter an, erreicht nach 30 min ein Maximum und sinkt danach kontinuierlich ab und ist nach 4 Stunden intrazellulär fast nicht mehr nachweisbar. Die Konzentration von reifem Cathepsin S steigt steil an, erreicht nach 2 Stunden ein Maximum und bleibt auf diesem Niveau. Seine Konzentration ist nach 4 Stunden 200fach höher als die des Precursors. Aus der Summe der intrazellulären Konzentrationen von Procathepsin S und Cathepsin S wird aber auch deutlich, dass nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden keine weitere Aufnahme von Procathepsin S stattfindet (Abb. 16C). Aus der Konzentrationsbestimmung am Ende der jeweiligen Inkubationszeiten geht hervor, dass die Procathepsin S-Konzentration in den Medien innerhalb von 4 Stunden um 50 % absinkt, was dem Betrag entspricht, der von den Zellen aus dem Medium aufgenommen wird. Die Summe der Konzentrationen der Cathepsin S-Formen aus den jeweiligen Zellextrakten und den zugehörigen Medien zeigt, dass keine größeren Verluste auftreten, da diese nach 4 Stunden um lediglich 15 % absinkt. Dieser Wert ist eher noch niedriger, da in dieser Bilanz die Konzentration des Intermediates der Prozessierung von Procathepsin S (Nissler et al. 1998, 1999) nicht einbezogen wurde (Abb. 16B, D). Im Medium waren auch keine Anzeichen für Prozessierung bzw. Proteolyse des Procathepsin S erkennbar. Die Aufnahme des Procathepsin S in die Zellen ist innerhalb der ersten Stunde linear. Das stimmt mit Endocytoseexperimenten mit Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Antikörpern durch Fibroblasten bzw. Colon-Carcinom-Zellen überein (Bräulke et al., 1992).

Für die Tatsache, dass nach 2 Stunden keine weitere Aufnahme von Procathepsin S stattfindet, gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Da die Affinität der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren zu lysosomalen Enzymen unterschiedlich ist, wäre es denkbar, dass der kD-Wert des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors für Procathepsin S im Bereich der in diesem Endocytoseexperiment angebotenen Procathepsin S-Konzentration liegt. Damit könnte das Absinken der Procathepsin S-Konzentration im Medium die Senkung der Endocytosegeschwindigkeit erklären. Das ist jedoch unwahrscheinlich, da nach 4-stündiger Inkubation ein hoher extrazellulärer Überschuss an Procathepsin S ( $> 100$ fach) vorliegt. Wahrscheinlicher ist eine Begrenzung der Procathepsin S-Aufnahme durch die Geschwindigkeit der Rezyklisierung der endocytierten Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren in die Plasmamembran. Am Beispiel der Internalisierung der Mannose-6-Phosphat- und LDL-Rezeptoren an P12-Zellen wurde gezeigt, dass die Rezeptoren zwar schnell (10 min) aufgenommen werden, jedoch dauert der Transport der Rezeptoren nach Fusion mit endosomalen Vesikeln zum trans-Golgi-Apparat, der eine Voraussetzung für die Rezyklisierung der Rezeptoren in die Plasmamembran ist, mehrere Stunden (Duncan und Kornfeld, 1988, Green und Kelly, 1992). Es ist anzunehmen, dass sowohl die Neusynthese von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, als auch der Prozess der Aufnahme und Rezyklisierung regulatorischen Kontrollmechanismen der Zelle unterliegt.

Bei den Endocytoseexperimenten mit Procathepsin S-N104Q erreicht die Aufnahme von Procathepsin S-N104Q ihr Maximum später als die des Wildtyps, jedoch sistiert im Gegensatz zum Wildtyp-Procathepsin S die Aufnahme der Mutante nicht. In Übereinstimmung mit dem Wildtyp wird reifes Cathepsin S nach einer Endocytosezeit von einer Stunde sichtbar. Die Endocytoseexperimente mit einem Procathepsin S-N104Q-Präparat, das nicht mit reifem Cathepsin S kontaminiert war, beweisen, dass der nicht glycosylierte Precursor von der Zelle aufgenommen und zum reifem Enzym prozessiert wird. Maximale Konzentrationen von reifem Cathepsin S werden aber erst nach vier Stunden erreicht. Diese Unterschiede weisen auf differente Rezeptoren mit unterschiedlichen Eigenschaften hin. Die Internalisierung und der Transport in die prälysosomalen/lysosomalen Kompartimente erfolgt offenbar mit der gleichen Geschwindigkeit. Das Ausmaß der Endocytose ist jedoch viel niedriger als das des Wildtyps. Dieser Unterschied wird durch die in den Abb. 16 und 17 dargestellten Intensitäten der Autoradiogramme nicht repräsentiert. Im Interesse einer empfindlichen Auswertung wurden die Signale maximal verstärkt. Die korrekten Verhältnisse spiegeln Zellfraktionierungsexperimente früherer Untersuchungen wieder (Nissler et al., 1998).

Im folgenden wurde die Abhängigkeit der Endocytose von der Konzentration des [ $^{35}$ S]Procathepsin S-N104Q geprüft. Bei niedrigen Procathepsin S-N104Q-Konzentrationen (Abb. 18

Bahn 1) ist bei der Endocytosezeit von 1h kein Procathepsin S, sondern nur reifes Enzym sichtbar. Unter diesen Bedingungen wird der aufgenommene Precursor quantitativ nahezu vollständig aufgenommen und prozessiert. Erst bei höheren Konzentrationen wird ein Anstieg von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q neben dem des reifen Cathepsin S erkennbar, der einem Maximum zustrebt (Abb. 18). Aus den oben aufgeführten Problemen bei der Konzentrierung des Enzyms, die in der Hydrophobizität des Enzyms begründet sind, ließen sich keine Konzentrationen einstellen, die den sättigenden Bereich erreichen. Für die Hydrophobizität ist im wesentlichen die Propeptidregion verantwortlich. Versuche, die Endocytose von rekombinantem, nicht glycosyliertem [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-Propeptid zu messen, scheiterten an der geringen Löslichkeit des Propeptides; es ist eine Konzentration von mehr als 30 % Dimethylsulfoxid oder Acetonitril erforderlich, um das Protein in den Konzentrationen in Lösung zu bringen, wie sie die Endocytose-Experimente erfordern. Eine Endocytose konnte mit diesem Präparat nicht nachgewiesen werden (Nissler, Pupyshev, Institut für Biochemie der FSU Jena). Auch die Biotinylierung des konzentrierten Enzyms verlief im Vergleich zur Biotinylierung des unkonzentrierten Proteins mit schlechter Ausbeute.

Die eindeutige Abhängigkeit der Endocytose von der Procathepsin S-N104Q-Konzentration und der Endocytosezeit sind mit der Hypothese einer spezifischen, Mannose-6-Phosphat-unabhängige Aufnahme von nicht glycosyliertem Procathepsin S durch ein Membranbindungsprotein vereinbar, jedoch kann eine „fluid phase Endocytose“ nicht ausgeschlossen werden. Ein wichtiges Kriterium für die Existenz eines Membranbindungsproteins ist der Nachweis der Kompetition von [<sup>35</sup>S]markiertem Procathepsin S-N104Q mit nicht markiertem Procathepsin S-N104Q bei der Endocytose durch HEK 293-Zellen. Naive HEK 293-Zellen wurden mit identischen Mengen an [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q ohne und mit Zusatz von nicht markiertem, gereinigtem Procathepsin S-N104Q in 3 verschiedenen Konzentrationen 1h inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion von Precursor und reifem Enzym nach Immunpräzipitation aus den Extrakten der gewaschenen Zellen. Mit steigender Konzentration an Procathepsin S-N104Q sinkt die Endocytose von [<sup>35</sup>S]markiertem Procathepsin S-N104Q. In Abb. 21 ist das Ausmaß der Hemmung der Endocytose von [<sup>35</sup>S]markiertem Procathepsin S-N104Q von dem 10-20fachen Überschuss an nicht markiertem Procathepsin S-N104Q dargestellt. Die Hemmung beträgt unter diesen Bedingungen bis zu 50 %. Der Berechnung der Hemmung liegt die Annahme zugrunde, dass reifes Cathepsin S im Gegensatz zu Procathepsin S-N104Q nicht von den HEK 293-Zellen endocytiert wird. Dieser Fakt wurde in Kapitel 4.5. bewiesen. Aus der Abb. 21 geht hervor, dass unter diesen Bedingungen das Maximum der Inhibition noch nicht erreicht ist. Dies ist möglicherweise darin begründet, dass

aus den oben genannten Gründen keine höher konzentrierte Procathepsin S-N104Q-Lösung hergestellt werden konnte. Trotzdem ist der Nachweis einer Kompetition von Procathepsin S-N104Q um ein hypothetisches Membranbindungsmotiv ein wichtiges Indiz für die Existenz eines Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungsweges.

Ein methodisches Problem bestand in der Bestimmung der Procathepsin S-N104Q-Konzentration in den Kompetitionsmedien zur Ermittlung des Verhältnisses von markiertem und nicht markiertem Procathepsin S-N104Q, da einerseits die zur Verfügung stehenden Proteinbestimmungsmethoden zu unempfindlich sind und andererseits die Medien einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an Fremdproteinen enthielten. Es gelang die Bestimmung der Procathepsin S-Konzentration durch Quantifizierung von Westernblots mit Hilfe des ECL-Systems unter Verwendung von gereinigtem Procathepsin S bekannter Konzentration als Eichprotein (Mach et al., 1994). Obwohl die Ausbildung des Antigen-Antikörper-Komplexes niemals erschöpfend sein kann, wurde diese Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Abb. 19 zeigt eine lineare Beziehung zwischen Proteinkonzentration und dem ECL-Signal, allerdings in einem sehr engen Konzentrationsbereich zwischen 10–90 ng, was die Verdünnung der zu bestimmenden Proben erfordert, so dass ein gut messbares Signal im Bereich dieser Eichkurve liegt.

Eine Funktion des Procathepsin S-Propeptides besteht darin, den Precursor in die Lysosomen zu sortieren. Es ist anzunehmen, dass sich auch das Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierungssignal in dieser Region befindet. Zum Beweis dieser Hypothese wurde geprüft, ob neben Procathepsin S auch reifes Cathepsin S von den Zellen aufgenommen wird.

Für die Endocytoseexperimente von reifem Cathepsin S wurde versucht, [<sup>35</sup>S]markiertes Cathepsin S aus [<sup>35</sup>S]Procathepsin durch in vitro-Prozessierung herzustellen. Diese Versuche waren erfolglos. Deshalb wurde für dieses Experiment Cathepsin S biotinyliert und der Nachweis von biotinyliertem Cathepsin S im Zellextrakt durch das ECL-System geführt. Hierfür stand ein reifes Cathepsin S-Präparat zur Verfügung, das von Dr. I. Wenz, Institut für Biochemie Jena, durch in vitro Prozessierung eines mit dem Baculovirus-System exprimierten Procathepsin S hergestellt und gereinigt worden war. Die Biotinylierung erfolgte mit dem Biotinylierungskit von AMERSHAM (vergl. 3.4.2). Vorversuche und auch Abb. 22C beweisen, dass der Anti-Cathepsin S-Antikörper auch biotinyliertes Cathepsin S präzipitiert. Im Zellextrakt von naiven HEK 293-Zellen war nach zweistündiger Inkubation mit biotinyliertem Cathepsin S kein reifes Cathepsin S sichtbar (Abb. 22C). Die Immunpräzipitation des reifen Cathepsin S erfolgte aus dem Medium nach Abschluss des Endocytoseexperimentes, was bedeutet, dass kein Selbstverdau des Enzyms stattgefunden hat.

Das war zu befürchten, da sich reifes Cathepsin S durch ein breites pH-Optimum auszeichnet und demzufolge bei dem pH-Wert der Endocytoseexperimente eine nennenswerte katalytische Aktivität zu erwarten wäre. Um den Selbstverdau zu verhindern, wurde den Ansätzen der Cysteinprotease-Hemmstoff E64 zugesetzt. Dieser Hemmstoff führt durch Einlagerung in die Krypte des katalytischen Zentrums zu einer irreversiblen Hemmung der Aktivität des Enzyms. Es ist unwahrscheinlich, dass das proteolytische Zentrum für eine mögliche Endocytose des reifen Enzyms verantwortlich ist, so dass der Einsatz dieses Inhibitors das Ergebnis dieses Experimentes nicht in Frage stellt. Ein weiterer Grund dafür, dass reifes Cathepsin S nicht endocytiiert wird, könnte darin bestehen, dass die Biotinylierung des Proteins eine mögliche Endocytose verhindert. Um dies zu prüfen, wurde zur Kontrolle Wildtyp-Procathepsin S und Procathepsin S-N104Q biotinyliert und HEK 293- Zellen zur Endocytose angeboten. In dem in Abb. 22A, B dargestellten Endocytoseexperiment wird ersichtlich, dass sowohl biotinyliertes Wildtyp-Procathepsin S als auch biotinyliertes Procathepsin S-N104Q von den HEK 293-Zellen gebunden, aufgenommen und in die Lysosomen transportiert werden, was durch das Auftreten von reifem Cathepsin S angezeigt wird. Weiterhin wird in Abb. 22D ersichtlich, dass die Biotinylierung die Endocytose nicht behindert. Die geringe Verzögerung im Vergleich zur radioaktiven Markierung liegt im Rahmen des experimentellen Fehlers. Die Tatsache, dass reifes Cathepsin S im Gegensatz zu Procathepsin S nicht von Zellen gebunden und aufgenommen wird, beweist erstens die Lokalisation des Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungsmotives in der Proregion des Enzyms und schließt zweitens eine Aufnahme der Protease durch „fluid phase-Endocytose“ aus.

Bei den Experimenten zum Nachweis der Kompetition von nicht glycosyliertem Procathepsin S mit [<sup>35</sup>S]markiertem Enzym (Vergleiche Kapitel 4.4.2.) wurde ein Präparat eingesetzt, das neben Procathepsin S auch geringe Mengen an Cathepsin S enthielt. Bei der präparativen Darstellung des Enzyms in den erforderlich hohen Mengen ließ sich eine Prozessierung nicht verhindern. Der Berechnung der Kompetitionsverhältnisse wurde die Hypothese zugrunde gelegt, dass reifes Cathepsin S nicht endocytiiert wird und dass das in den Zellen nachweisbare reife Cathepsin S ausschließlich aus dem endocytiierten Procathepsin S-N104Q entstanden ist. Diese Berechnungsgrundlage ist somit begründet.

## **5.2. Ultrastrukturelle Untersuchung zur Membranlokalisation von nicht glycosyliertem Procathepsin S**

Durch Laser Scanning Mikroskopie und Elektronenmikroskopie wurde mit immunhistochemischen Methoden in HEK 293 Zellen, die entweder Wildtyp- oder nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren, spezifische Cathepsin S-Signale in Vesikeln nachgewiesen, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Lysosomen handelt (Abb. 25, 26). Da die Vesikel nicht die typische lysosomale Struktur aufweisen, wurden zur Identifikation der Vesikel zwei lysosomale Reporter-Proteine elektronenmikroskopisch dargestellt (Nissler et al., 2002). Es gelang der immunhistochemische Nachweis des lysosomalen Membranglykoproteins LAMP1 in den Vesikelmembranen mit Hilfe eines LAMP 1-Antikörper sowie der cytochemische Nachweis der Aktivität des lysosomalen Markerenzym saure Phosphatase im Vesikellumen mit Hilfe der Cerium-Technik (Halbhuber et al., 1994, 1996). Unterschiede in der Intensität der Cathepsin-spezifischen Markierung sind darauf zurückzuführen, dass die Transfektionsrate der Zellen nicht 100 % ist. Hinsichtlich der subzellulären Verteilung ergeben sich Unterschiede zwischen beiden Transfektanten. Während in den Zellen, die Wildtyp-Procathepsin S exprimieren, die spezifischen Immunkomplexe hauptsächlich in den Vesikeln dominieren (Abb. 25), sind in den Zellen, die nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren, die entsprechenden Signale diffus im Zytoplasma verteilt und nur vereinzelt in Vesikeln zu sehen (Abb. 26). Zusätzlich haben beide Transfektanten signifikante Mengen an Immunkomplexen an und in der Plasmamembran, die gleichmäßig über die Oberfläche verteilt sind. Dieser Befund entspricht der Hypothese von zwei möglichen Sortierungswegen bei der Endocytose von Procathepsin S: dem Mannose-6-Phosphat-abhängigen Weg (Pfad D in Abb. 6) und einem alternativen Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Weg (Pfad B in Abb. 6). Im Kapitel 4.3.2. wurde gezeigt, dass die beiden Sortierungswege mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Effizienz ablaufen. Da bei der Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierung die Geschwindigkeit und Effizienz geringer sind, lässt erklären, warum Procathepsin S-N104Q sich länger im Cytoplasma aufhält und durch Elektronenmikroskopie sichtbar wird.

Da der für die Immunhistochemie verwendete Antikörper Procathepsin S, reifes Cathepsin S und das abgespaltene Propeptid bindet, können Aussagen über die Natur der zur Darstellung gekommenen Immunkomplexe nur durch Heranziehen biochemischer Untersuchungen gemacht werden. In Zellfraktionierungsexperimenten wurde durch Cathepsin S-Aktivitätsbestimmung und Immunpräzipitation nachgewiesen, dass sich in den Zellen, die Wildtyp-Procathepsin S exprimieren, hauptsächlich reifes Cathepsin S in den Lysosomen

befindet und nur geringe Mengen an Procathepsin S im Zellextrakt enthalten sind. Demgegenüber ist der überwiegende Anteil des Enzyms in den Zellen, welche die Mutante exprimieren, Procathepsin S. Neben nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q wurde in den Lysosomen dieser Zellen geringe Mengen an reifem Cathepsin S nachgewiesen (Nissler et al., 1998). Die in den ultrastrukturellen Untersuchungen beobachtete mengenmäßige Verteilung der Cathepsin S-Formen zwischen den Vesikeln und dem Zytoplasma stimmt qualitativ gut mit den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen überein. Es konnte gezeigt werden, dass in das Medium sezerniertes Procathepsin S-N104Q von naiven HEK 293-Zellen gebunden und endocytotiert wird und auf diesem Weg die Lysosomen erreicht. Das stellt die Grundlage der Hypothese dar, dass neben Mannose-6-Phosphat ein weiteres lysosomales Sortierungssignal existiert. Die Temperaturabhängigkeit der Endocytose (Nissler et al., 1998) sowie die Untersuchungen dieser Arbeit über die Zeitabhängigkeit, Konzentrationsabhängigkeit und der Nachweis kompetitiver Verhältnisse der Endocytose stützen diese Hypothese.

Zellfraktionierungsexperimente von postnucleärem Überstand von Zellen, die radioaktiv markiertes Procathepsin S-N104Q exprimieren, zeigten, dass Procathepsin S in überwiegender Menge in der Membranfraktion enthalten ist (Nissler et al., 1998). Das findet Entsprechung in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von beiden Transfektanten, bei denen signifikante Mengen an spezifischem Immunpräzipitat in der Plasmamembran zur Darstellung kommen (Abb. 25, 26). Sie sind an Invaginationen und endocytotischen Vesikeln sichtbar. Es handelt sich um gebundenes Procathepsin S, denn reifes Cathepsin S wird nicht sezerniert und sezerniertes Procathepsin S akkumuliert im Medium und reift nicht (Nissler et al., 1998). Außerdem wird reifes Cathepsin S nicht von HEK 293-Zellen endocytotiert (vergl. 4.5.). Die Ultrastrukturuntersuchungen beweisen, dass mutiertes Procathepsin S-N104Q an die Plasmamembran gebunden wird, wie es bei Endocytosexperimenten von Nissler et al., 1998 schon angezeigt wurde.

Darüber hinaus wurden Cathepsin S-spezifische Immunkomplexe am inneren Blatt von Lysosomenmembranen nachgewiesen (Abb. 25, 26). Es kann nicht differenziert werden, um welche Cathepsin S-Form es sich handelt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden u.a. die Lysosomen beider Transfektanten isoliert und mechanisch in hypotonem Medium ohne Detergenzien aufgeschlossen. Im Lysosomenextrakt und in der Lysosomenmembranfraktion erfolgte die Analyse der Cathepsin S-Formen durch Westernblotting. In den Lysosomenextrakten beider Transfektanten wurde Procathepsin S und reifes Cathepsin S nachgewiesen (Abb. 23). Anzumerken ist, dass der Ansatz und die Entwicklung der Blots



mittels ECL-Nachweis einschließlich elektronischer Signalverstärkung mit dem Ziel maximaler Signalthöhe ausgeführt wurden. Daher entsprechen die quantitativen Verhältnisse der Cathepsin-Formen dieser Blots der beiden Transfektanten nicht den realen Verhältnissen: Die Mutante kommt im Verhältnis zum Wildtyp in viel niedriger Menge vor (Nissler et al., 1998). Das Experiment beweist, das Procathepsin S-N104Q in die Lysosomen gelangt ist und dort reifte, obwohl ihm das Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignal fehlt.

Die präparierten Lysosomenmembranen der jeweiligen Transfektanten enthalten Wildtyp-Procathepsin S, das an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gebunden ist bzw. nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q, welches Mannose-6-Phosphat-unabhängig gebunden wird. Überraschenderweise enthalten die Lysosomenmembranen beider Transfektanten auch reifes Cathepsin S. Die Bindung von Wildtyp-Procathepsin S an die Lysosomenmembran lässt sich damit erklären, dass es sich um Procathepsin S handelt, das nach Fusionierung der Procathepsin S-beladenen Vesikel mit der Lysosomenmembran über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor membrangebunden ist und noch nicht prozessiert wurde. Die hypothetische Mannose-6-Phosphat-unabhängige Bindungsregion im mutierten Procathepsin S-N104Q wird ebenfalls in der Proregion vermutet. Da die Bildung des reifen Cathepsins nach dem Einschleusen des Precursors in die Lysosom stattfindet, ist die Existenz eines Sortierungssignals im reifen Enzym nicht zwingend erforderlich.

In Analogie zu Befunden zu anderen Cathepsinen ist es eher unwahrscheinlich, dass sich spezifische Cathepsin S-Bindungsstellen in der Lysosomenmembran befinden. Am Beispiel des Cathepsin D zeigten Nishimura und Himeno, 1995, dass eine Bindung von reifem Cathepsin D an die Lysosomenmembran nach intralysosomaler Prozessierung des Cathepsin D-Precursors nicht mehr stattfindet. Diment et al. (1988) bewiesen die Membranassoziation von Procathepsin D an endosomale/lysosomale Membranen mit nachfolgender membranassoziierter Prozessierung, wobei das reife Cathepsin D noch über mehrere Stunden membrangebunden bleibt. Ähnliche Verhältnisse könnten auch für die Bindung und Prozessierung von Procathepsin S zutreffen.

### **5.3. Nachweis von Bindungsproteinen für nicht glycosyliertes Procathepsin S-N104Q in Membranen von HEK 293-Zellen**

Die Untersuchungen dieser Arbeit zur Endocytose von Procathepsin S-N104Q stützen die Hypothese der Existenz eines Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungsweges. Die Abhängigkeit der Endocytose des nicht glycosylierten Precursors von der Inkubationszeit bzw. der Procathepsin S-Konzentration insbesondere aber der Beweis der Kompetition von Procathepsin S-N104Q bei der Bindung und Endocytose machen die Aufnahme des Enzyms durch ein spezifisches Membranbindungsmotiv, das nicht einem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor entspricht, wahrscheinlich. Ein unspezifischer Aufnahmemechanismus z.B. durch „fluid phase“-Endocytose, ist unwahrscheinlich, weil das reife Cathepsin S im Gegensatz zu Procathepsin S nicht von den HEK 293-Zellen endocytotiert wird.

Weiterhin konnte in verschiedenen Untersuchungen, wie z.B. durch subzelluläre Fraktionierung von HEK 293 Zellen, die nicht glycosylierte Procathepsin S exprimieren (Nissler et al., 1998) als auch durch ultrastrukturelle Untersuchungen dieser Zellen (siehe Kapitel 4.7.) eine Membranlokalisation von nicht glycosyliertem Procathepsin S-N104Q nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der genannten Untersuchungen sind starke, jedoch indirekte Hinweise für einen Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Eintransportmechanismus in HEK 293-Zellen.

Im folgenden wurde versucht, das spezifische Membranbindungsprotein für Procathepsin S-N104Q zu identifizieren. Vielversprechend war der Nachweis der Bindung von nicht glycosyliertem [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q an präparierte mikrosomalen Membranen von unbehandelten HEK 293-Zellen im Rahmen eines Dot-Blotes nach der Inkubation (45 min) mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q. Die elektrophoretische Auftrennung der mikrosomalen Membranpräparation und eine dreistündige Inkubation der geblotteten Fraktionen mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q (Overlay-Technik) ließen jedoch kein reproduzierbares Bindungsmotiv unter den Membranproteinen erkennen. Der Nachweis eines Bindungsprotein mit der Overlay-Technik erfordert, dass die elektrophoretisch aufgetrennten, denaturierten Membranproteine nach dem Blotvorgang und nach Entfernung des SDS so renaturieren, dass sie ihre ursprüngliche Bindungskapazität wiedererlangen. Dies ist offenbar nicht eingetreten. Weiterhin ist denkbar, dass es sich bei dem möglichen Bindungsprotein um ein Heterooligomer handelt, dessen Monomere elektrophoretisch getrennt werden. Eine vollständige Reassemblierung des Bindungsmotives auf der Blotmembran ist danach von vornherein ausgeschlossen.

Die SDS-PAGE/Blot-Analyse von präparierten mikrosomalen Membranen von HEK 293-Zellen, die [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q exprimieren, ließ ebenfalls kein Bindungsmotiv

erkennen. Zu dem gleichen Resultat führten analoge Experimente, bei denen präparierte Mikrosomen unbehandelter HEK 293-Zellen nachträglich mit nicht glycosyliertem [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q inkubiert wurden. Der Zusatz von Triton zum Öffnen von Vesikeln war ohne Einfluss.

Versuche, einen möglichen Komplex von Enzym und Membranprotein durch Immunpräzipitation zu isolieren, waren ebenfalls erfolglos. Es ist zu vermuten, dass die Bindung von nicht glycosyliertem Procathepsin S an das hypothetische Membranbindungsprotein durch nicht kovalente Interaktionen erfolgt, die so instabil ist, dass der Ligand bei den nachfolgenden Aufarbeitungsschritten entfernt wird. Letzteres wurde von McIntyre et al., 1991, 1993; 1994 für ein Membranprotein beschrieben, welches Procathepsin L bindet. Es wurde zudem beobachtet, dass höhere Salzkonzentrationen eine Ablösung des Enzyms vom Bindungsprotein während des Blottings und nachfolgender Waschvorgänge verursachten. Aus diesem Grund wurde versucht, den Enzym-Membranprotein-Komplex durch Zusatz eines Crosslinkers zu stabilisieren. Nach Inkubation von unbehandelten HEK 293-Zellen mit [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q wurden die Zellen nach Entfernen des Endocytosemediums mit einer frisch hergestellten DTSSP-Lösung, einem nicht membrangängigen Crosslinker, behandelt. Anschließend wurde versucht, den stabilisierten Procathepsin S-N104Q-Membranprotein-Komplex durch subzelluläre Fraktionierung zu isolieren. Der Komplex wurde mit dem Anti-Cathepsin S-Antikörper aus der Membranfraktion der Percoll-Gradientenzentrifugation immunpräzipitiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Immunpräzipitates in Abwesenheit von Mercaptoethanol kamen im hochmolekularen Bereich radioaktive Banden zur Darstellung, die Membranproteine repräsentieren, die unter anderem Procathepsin S gebunden haben. Die Molmasse dieser Banden ist so hoch, dass es sich nicht um Procathepsin S-Dimere handeln kann.

Ein Vorzug des gewählten Crosslinkers ist, dass seine beiden funktionellen Gruppen mit einer Disulfidbindung verknüpft sind, die durch Mercaptoethanol gespalten werden kann. Somit kann der Komplex von kovalent verknüpftem Procathepsin S und Membranprotein nach seiner Isolierung durch Zusatz von Mercaptoethanol gespalten werden. Der Nachweis von freiem Procathepsin S nach elektrophoretischer Auftrennung der Immunpräzipitate in Gegenwart von Mercaptoethanol beweist, dass unter den gewählten Bedingungen Procathepsin S Bestandteil eines Komplexes mit Membranproteinen ist. Abb. 27 gibt ein Experiment wieder, bei dem dieser Nachweis gelang. Gleichzeitig traten zusätzlich Banden auf, die eine höhere Molmasse als Procathepsin S aufwiesen. Bisher konnte nicht bewiesen werden, ob es sich bei diesen um das gesuchte Membranbindungsprotein handelt. Das [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q-

haltige Medium weist im Autoradiogramm der SDS-PAGE eine intensive Procathepsin S-Bande auf, jedoch auch Banden im hochmolekularen Bereich. Das Autoradiogramm der SDS-PAGE der Immunpräzipitation des [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-Medium nach Abschluss des Endocytoseexperimentes enthält ebenfalls neben der kräftigen Procathepsin S-Bande diese hochmolekularen, radioaktiven Formen. Es könnte der Verdacht entstehen, dass es sich bei den hochmolekularen Signalen der Membranfraktion (Fraktion 2 der Percoll-Gradienten-Zentrifugation Abb. 27, Bahn 2) um angereicherte markierte Proteine handelt, die schon vor Endocytose als Verunreinigung enthalten sind. Hochmolekulare radioaktive Proteine waren bei der Immunpräzipitation der acht Fraktionen der Percoll-Gradienten-Zentrifugation ausschließlich in der Membranfraktion (Fraktion 2) enthalten. Sollte es sich bei den hochmolekularen Formen um Fremdproteine des Mediums handeln, wäre zu erwarten, dass sie auch in anderen subzellulären Fraktionen auftreten, sofern es sich bei diesen nicht um Membranproteine oder Proteine mit Affinität zu Membranproteinen handelt. Durch den Nachweis von Procathepsin S nach Mercaptoethanol-Behandlung der Immunpräzipitate ist sehr wahrscheinlich, dass sich unter den hochmolekularen Proteinbanden der Procathepsin S-Membranprotein-Komplex verbirgt. Versuche, die hochmolekularen Proteine elektrophoretisch weiter aufzutrennen z.B. durch Verwendung von Trenngelen mit geringerem Polyacrylamidgehalt waren bisher erfolglos.

Die Isolierung des Procathepsin S-N104Q-Membranprotein-Komplexes aus dem Gemisch hochmolekularer Proteine durch weitere, z.B. chromatographische Trennverfahren, erfordert die Optimierung der Identifikation des Komplexes durch den Nachweis des freigesetzten Procathepsin S. Es wurde versucht, den Komplex durch Erhöhung der Anzahl gebildeter Fraktionen nach Percoll-Gradienten-Zentrifugation mit erhöhter Reinheit zu isolieren. Diese Versuche scheiterten bislang an der Sensitivität. Im folgenden wurde versucht, die Empfindlichkeit durch Einsatz eines anderen Proteinmarkierungssystems z.B. des Biotin-Streptavidin-ECL-Systemes zu steigern. Deshalb wurden HEK 293-Zellen mit konzentriertem Medium, welches nicht glycosyliertes Procathepsin S enthielt, inkubiert, mit DTSSP versetzt und anschließend mit dem Biotinylierungsreagenz des AMERSHAM-Biotinylierungskits biotinyliert. Nach Zellfraktionierung und Immunpräzipitation des Procathepsin S-Membranprotein-Komplexes erfolgte nach SDS-PAGE/Blot der ECL-Nachweis. Neben Banden, die dem durch Mercaptoethanol freigesetzten Procathepsin S entsprechen, kamen jedoch eine Vielzahl unspezifischer Banden zur Darstellung. In der Absicht, die Anzahl unspezifischer Banden zu verringern, wurden bei gleichem experimentellen Ansatz nicht die intakten Zellen, sondern nur die durch Percollgradientenzentrifugation gewonnenen Membranfraktionen biotinyliert.

Die Zahl unspezifischer Banden konnten nur unbefriedigend reduziert wurde, somit stellt diese Markierungsmethode keine Alternative zur Verwendung von [<sup>35</sup>S]markierten Proteinen dar.

Zur Verbesserung des Nachweises von nicht glycosyliertem Procathepsin S, welches aus dem Procathepsin S-Membranprotein-Komplex freigesetzt wird sowie der Visualisierung des betreffenden Membranproteines selbst wurden HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q exprimieren, mit [<sup>35</sup>S]Methionin vitalmarkiert. [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q wird von diesen Zellen sezerniert und anschließend endocytiiert (Nissler et al., 1998). In Kapitel 3.3., 3.4. dieser Arbeit wurde die Endocytose von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q, das dem Medium naiver HEK 293-Zellen zugesetzt wurde, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Konzentration des zugesetzten Procathepsin S gemessen. Zu dem von diesen Untersuchungen abgeleiteten Zeitpunkt des Vitalmarkierungsexperimentes ist sicher, dass nicht glycosyliertes Procathepsin S an ein Membranbindungsprotein, welches nicht dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor entspricht, gebunden wird. Durch Zusatz von DTSSP wurde der Komplex stabilisiert. In der Autoradiographie dieses Experimentes (Abb. 28) konnte im Unterschied zu dem Bindungsexperiment der Abb. 27, in den Ansätzen mit Mercaptoethanol Procathepsin S spezifische Banden nicht nur in der Fraktion 2, sondern auch in den Fraktionen 3 und 4 detektiert werden. Diese Procathepsin S-Banden sind wesentlich intensiver und bestätigen damit die Freisetzung von nicht glycosyliertem Procathepsin S aus dem Komplex.

In den Ansätzen ohne Mercaptoethanol sind jedoch auch Spuren von Procathepsin S sichtbar. Es ist vorstellbar, dass Procathepsin S bei den Aufarbeitungsprozeduren auch ohne massiven Zusatz von Reduktionsmittel freigesetzt wird.

Im Molmassenbereich < 35 kDa sind Banden sichtbar, die der Größe des abgespaltenen Procathepsin S-Propeptides entsprechen. Diese Banden sind im Medium nicht vorhanden. Weiterhin bestehen keine Unterschiede der Intensität dieser Banden zwischen den Ansätzen mit und ohne Mercaptoethanol. Vorausgesetzt, dass es sich bei diesen nicht um einen Artefakt handelt, ist nicht auszuschließen, dass sich unter ihnen das Propeptid des Enzyms verbirgt, da auch im Bindungsexperiment mit naiven Zellen nach Mercaptoethanol-Zusatz eine solche isolierte niedrigmolekulare Bande nachgewiesen wurde (Abb. 27 B). Eine Prozessierung des Procathepsin S-N104Q im Komplex mit dem putativen Membranbindungsprotein sollte durch den Zusatz von Proteinasehemmstoffen verhindert sein. Da jedoch die Hemmstoffe mit Ausnahme des E 64 nicht zu einer 100%igen Hemmung der proteolytischen Aktivität führen, ist eine heterokatalytische Prozessierung während der langwierigen Isolierungsprozeduren des Komplexes nicht auszuschließen. Die Detektion des möglichen Propeptides ist dadurch

begünstigt, da sich 7 der 10 im Procathepsin S enthaltenen [<sup>35</sup>S]markierten Methionine im Propeptidanteil befinden. Reifes Cathepsin S war in den experimentellen Untersuchungen neben dem vermeintlichen Propeptid nicht erkennbar, was in der naturgemäß niedrigeren spezifischen Radioaktivität des reifen Enzyms begründet sein kann. Wenn man der Hypothese der Existenz des Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Bindungsmotives im Propeptidanteil folgt, ist denkbar, dass nach einer in vitro-Prozessierung des Procathepsin S im Komplex das reife Cathepsin bei den Waschschritten entfernt wird und nur das Propeptid durch Spaltung des Crosslinkers durch Mercaptoethanol freigesetzt wird.

Durch die Vitalmarkierung (Abb. 28) kommt eine Vielzahl von Proteinbanden zur Darstellung, nicht nur beschränkt auf Fraktion 2, sondern auch in den Fraktionen 3 und 4. Da die Fraktionen einer Immunpräzipitation unterzogen wurden, wäre zu erwarten, dass neben den drei Cathepsin S-Formen nur wenige Membranproteine nachgewiesen werden, da der Protein A-Sepharose-Anti-Cathepsin S-Membranprotein-Komplex intensiv gewaschen wurde. Demzufolge sind die Mehrzahl dieser Banden höchstwahrscheinlich unspezifischer Natur.

Bei dem Ansatz mit Mercaptoethanol-Behandlung werden im Bereich > 35 kDa Banden sichtbar, die im Medium nicht und im Ansatz ohne Mercaptoethanol in geringerer Intensität vorhanden sind. Es ist anzunehmen, dass sich unter ihnen das gesuchte Membranbindungsprotein befindet. In Abb. 28B ist zum Beispiel im Ansatz ohne Mercaptoethanol eine Proteinbande mit einer Molmasse von 72 kDa (Abb. 28B, Pfeil 2) erkennbar, die im Ansatz mit Mercaptoethanol nur in geringerem Maße sichtbar ist. Demgegenüber konnten im Ansatz mit Mercaptoethanol mehrere Banden, unter ihnen eine intensive, deren Molmasse mit 49 kDa bestimmt wurde (Abb. 28B, Pfeil 1), nachgewiesen werden. Sofern das nicht Membranproteine sind, die keinerlei Affinität zu nicht glycosyliertem Procathepsin S aufweisen, könnte es sich hierbei um den Komplex bzw. um das Membranprotein handeln, auch wenn die Stöchiometrie der Molmassen nicht genau zutreffend ist. Es ist aber auch denkbar, dass das Membranprotein für nicht glycosyliertes Procathepsin S aus mehreren Untereinheiten besteht, die bei der betreffenden Aufarbeitung mit geringerem Molekulargewicht imponieren, insbesondere dann, wenn nur eine der Rezeptoruntereinheiten das Enzym bindet.

Einen ersten Hinweis für das Vorkommen eines Mannose-6-Phosphat Rezeptor-unabhängigen Sortierungsmechanismus für lysosomale Enzyme wurde bei einer Lebererkrankung, der sogenannten I-Zell-Erkrankung, entdeckt. Bei dieser lysosomalen Speichererkrankung kommt es zu einem Verlust der katabolen Funktion der Lysosomen, die von einer Anreicherung von unverdaulichem Zellmaterial begleitet ist (Neufeld et al., 1975,1993). Diese Erkrankung kann

zum frühen Tod der Patienten führen. Ursache der Erkrankung ist ein Defekt der Phosphorylierung der endständigen Mannose-Reste in den Oligosaccharidseitenketten der lysosomalen Proteine, die für die Sortierung in die Lysosomen über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor verantwortlich sind (Hasilik und Neufeld, 1980, von Figura und Hasilik, 1986) (vergl. 2.5.). Trotz des Defektes enthalten die Lysosomen verschiedener Gewebe dieser Patienten lysosomale Enzyme in normaler Konzentration. Das kann nur damit erklärt werden, dass die Enzyme durch einen Mechanismus in die Lysosomen gelangt sind, der nicht auf dem Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignal basiert (Owada und Neufeld, 1982, Tsuji et al., 1988). Bei Tumorerkrankungen wurde ebenfalls eine veränderte Sortierung lysosomaler Enzyme beobachtet. Auffälligstes Kennzeichen ist eine Sekretion der inaktiven Proenzyme in den extrazellulären Raum. An zwei menschlichen Tumorzell-Linien wurde die Sekretion von Procathepsin D nachgewiesen, während nicht maligne menschliche Fibroblasten dieses Precursorprotein nicht sezernieren (Laurent-Matha et al., 1998). Charakteristisch für Tumorzellen ist jedoch neben der Überexpression der lysosomalen Proenzyme ihre gesteigerte Sekretion in das Medium (Capony et al. 1989). Für diese Hypersekretion werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht, wie z. B. die Senkung der Affinität der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren zu Mannose-6-Phosphat-markierten Proteinen bzw. eine Senkung der Anzahl der Mannose-6-Phosphat-Bindungsstellen der Rezeptoren (Capony et al., 1994, Mathieu et al. 1991). An knock-out-Mäusen, die den Kationen-abhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR 46) nicht exprimieren, wurde die gesteigerte Sekretion lysosomaler Enzyme bewiesen (Köster et al., 1993,1994). Die Sekretion lysosomaler Enzyme in das Medium ist jedoch nicht ausschließlich auf Tumorzellen begrenzt, da auch nicht maligne Zellen wie z.B. Makrophagen lysosomale Proenzyme, z. B. Procathepsin S, sezernieren (Nissler et al., 1998) können.

Sezerniertes Procathepsin D wird von normalen Fibroblasten wieder aufgenommen, es handelt sich dabei nicht um eine „fluid phase Endocytose“, sondern um einen spezifischen Prozess, der bei normalen Fibroblasten durch den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelt wird. Tumorzellen endocytieren ebenfalls sezerniertes Procathepsin D durch einen Rezeptor an der Zelloberfläche, der aber nicht mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor identisch (Laurent-Matha et al., 1998). Die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-unabhängige Endocytose von lysosomalen Proenzymen ist jedoch ebenfalls kein spezifisches Charakteristikum von Tumorzellen: Nicht maligne Zellen, z. B. kultivierte, menschliche Fibroblasten endocytieren das Sphingolipidaktivator-Precursor-Protein (Vielhaber et al., 1996) und die  $\beta$ -Glucuronidase von Rindern (Gonzalez-Noriega et al., 2001) Mannose-6-Phosphat-unabhängig. Die in dieser

Arbeit untersuchte Mannose-6-Phosphat-unabhängige Endocytose von nicht glycosyliertem Procathepsin S durch HEK 293-Zellen ist somit keine Ausnahmeerscheinung. HEK 293-Zellen verfügen über einen Mannose-6-Phosphat-abhängigen und einen Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Aufnahmemechanismus für Procathepsin S. Zur Untersuchung alternativer Sortierungsmechanismen lysosomaler Enzyme existieren verschiedene Versuchsansätze, wie Experimente in Gegenwart hoher Konzentrationen von Mannose-6-Phosphat (Pohlmann et al., 1984, Laurent-Matha et al., 2002, Muschol et al., 2002), Experimente an Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-defizienten Zellen (Ludwig et al., 1994), der Einsatz von Tunicamycin, welches die Synthese des Mannose-6-Phosphates blockiert (Kuliawat und Arvan, 1994, McIntyre et al., 1994, Nishimura et al., 1995, Claveau und Riendeau, 2001) oder Untersuchungen an Zellen, die rekombinante Enzyme exprimieren, bei denen die Glycosylierung durch Entfernen der Glycosylierungsstelle mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese verhindert wird (McIntyre et al., 1991, 1993, 1994, Laurent-Matha et al., 1998). Immunhistochemische elektronenmikroskopische Untersuchungen, wie am Beispiel des Cathepsin S in dieser Arbeit gezeigt, gestatten den direkten Nachweis der intrazellulären Lokalisation der sortierten Proteine. Ein wichtiges Werkzeug ist die Expression von Fusionsproteinen von mutierten und Wildtyp-Proteinen mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) (Huete-Pérez et al., 1999, Moin et al., 2000, Müntener et al., 2003). In Fibroblasten von Tieren, bei denen die Expression des M6P-Rezeptors verhindert wurde (knock-out-Mäuse), wurden lysosomale Enzyme in den Lysosomen nachgewiesen, wodurch die Hypothese der Existenz eines Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungsweges gestützt wird (Ludwig et al., 1994, Dittmer et al., 1999). Bisher wurden in der Literatur für Cathepsin C (Mainferme et al., 1985), Cathepsin D (Rijnboutt et al., 1991a, Glickman und Kornfeld, 1993), Cathepsin B (Tanaka et al., 2000b), Cathepsin H (Tanaka et al., 2000a), Cathepsin S (Nissler et al., 1998), Cathepsin L (McIntyre et al., 1994) sowie für Fucosidase (DiCioccio et al., 1993), Aspartatglucosaminidase (Tikkanen et al., 1995) und für das GM<sub>2</sub>-Aktivatorprotein (Glombitza et al., 1997) ein zum Mannose-6-Phosphat Rezeptor-System alternativer Sortierungsweg postuliert.

Neben den Untersuchungen eines alternativen Sortierungsmechanismus konnte bei einigen Proteasen wie z.B. bei Cathepsin B (Authier et al., 1995), C (Burge et al., 1991), D (Diment et al., 1988, Nishimura et al., 1995, McIntyre et al., 1991), L (McIntyre et al., 1991, 1993, 1994) und S (Nissler et al., 2002) eine Mannose-6-Phosphat-unabhängige Assoziation an Zellmembranen und lysosomale Membranen gezeigt werden, jedoch wurde ein entsprechender Rezeptor bisher nicht identifiziert.



Bei der Suche nach einem Bindungsmotiv im lysosomalen Enzym und einem Rezeptorprotein in der Plasmamembran identifizierten McIntyre et al. 1994 ein integrales Membranprotein, das Procathepsin L reversibel bindet. Die Bindung ist bei pH 5 stabil, was die Grundlage für die Identifikation des Bindungsmotives bildet. Der Zusatz von hohen Mannose-6-Phosphat-Konzentrationen ist ohne Einfluss, was beweist, dass der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor nicht beteiligt ist.

Eine derartige Bindung wurde bisher bei keiner anderen Cysteinprotease nachgewiesen.

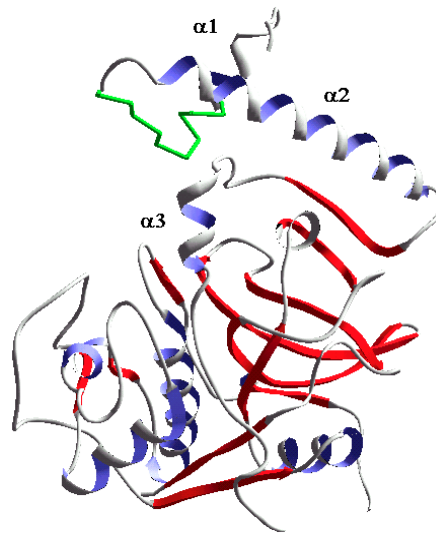
Der Nachweis der Bindung von Procathepsin L, nicht aber von reifem Cathepsin L zeigte, dass das Motiv im Propeptidanteil des Procathepsin L lokalisiert ist. Mit Hilfe der Overlay-Technik gelang zudem der Nachweis eines Membranproteins von einer Größe von 43 kDa, welches unter den entsprechenden Bedingungen Procathepsin Mannose-6-Phosphat-unabhängig bindet (McIntyre et al., 1993, 1994). Durch Einsatz verschiedener synthetischer Peptide sowohl aus den N-terminalen als auch dem C-terminalen Anteil des Procathepsin L war ein Peptid von nur 9 Aminosäuren konzentrationsabhängig in der Lage, die Bindung von Procathepsin L an das Membranprotein zu verhindern (McIntyre et al., 1994). Das Nonapeptid K<sub>33</sub> – S – T – H – R – R – L – Y – G<sub>41</sub> befindet sich im Propeptidanteil des Procathepsin L in einer Schleife zwischen zwei Helices. Diese Motiv ist in einigen Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen des Clans A humaner, tierischer und parasitärer Herkunft hoch konserviert, wie Abb. 29 zeigt.

Maus Procathepsin L	32...WKSTHRRLY..
Cruzain	41...FKQKHGRVY..
Humanes Procathepsin L	32...WKAMHNRLY..
Humanes Procathepsin S	31...WKKTYGKQY..
Humanes Procathepsin K	29...WKKTHRKQY..
Humanes Procathepsin H	35...FKSWMSKHR..
GICP1	32...WKAG I PKRF..
GICP2	32...WKAG I PKRF..
GICP3	32...WKAG I PKRF..

**Abb. 29: Konservierte Aminosäuren im Propeptid von Proteasen, die für eine Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierung verantwortlich sind (Cathepsin L, McIntyre et al. 1994) oder sein können (GICP = *Gardia lamblia* cysteine protease)**

Die Lokalisation dieser Sequenz im Procathepsin S-Molekül ist in Abb. 30 grün markiert. Es wird deutlich, dass dieser Bereich des Propetides so prominent ist, dass ein Kontakt mit anderen Proteinen möglich erscheint.

McIntyre et al. 1994 führen die pH-abhängige Bindung von Procathepsin L an ein Membranprotein auf die innerhalb des Motives lokalisierten, basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin zurück, die sich auf der in das Cytosol ragenden Schleife zwischen der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - Helix, befinden. Auch Huete-Pérez et al., 1999 postulierten die Ausbildung von Salzbindungen zwischen diesen basischen Aminosäuren des Motivs und negativen Resten des Rezeptorproteins. Mutagenesestudien an der parasitären Protease Cruzain von Huete-Pérez et al., 1999 bewiesen, dass die genannten Aminosäuren für die Sortierung dieser Protease in die Lysosomen von Trypanosomen essentiell sind.



**Abb. 30: Strukturmodell von Procathepsin S**

Propeptid-blau, Cathepsin S-rot (Kaulmann et al., 2003), mögliches Bindungsmotiv (konservierte AS)-grün

Die Ergebnisse der Sortierungsexperimente von Cysteinproteasen der Protozoen geben eine mögliche Antwort auf die Frage nach der Bedeutung einer Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierung. Die Cysteinproteasen der Trypanosomen weisen Homologien zu humanen Cysteinproteasen auf, sie werden aber nicht glycosyliert. Das Mannose-6-Phosphat-Sortierungssystem kommt bei ihnen nicht vor; die Sortierung erfolgt durch das oben beschriebene neun Aminosäuren umfassende Membranbindungsmotiv (Huete-Pérez et al., 1999). Da diese Protozoen eine der ältesten Linien der evolutionären Entwicklung eukaryoter Zellen repräsentieren, ist das aus den neun Aminosäuren gebildete Membranbindungsmotiv im Propeptidanteil möglicherweise als ein entwicklungsgeschichtlich alter Sortierungsmechanismus anzusehen, der trotz Entwicklung des Mannose-6-Phosphat-Sortierungsmechanismus persistiert (Huete-Pérez et al., 1999, Sajid et al., 2000).

## 6. Schlussfolgerung

Es gibt Stoffwechselerkrankungen, die auf eine gestörte Sortierung lysosomaler Enzyme basieren. Für die Klärung der Ursachen dieser Erkrankungen und einen möglichen Therapieansatz ist die Kenntnis der normalen Sortierungsmechanismen eine Voraussetzung. Es gibt Hinweise, dass neben dem gut untersuchten Mannose-6-Phosphat-Sortierungsweg alternative Sortierungsmechanismen für lysosomale Enzyme existieren.

Zur Untersuchung der Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierungsweges am Beispiel des Cathepsin S wurde eine Procathepsin S-Mutante zur Expression gebracht, bei der die Ausbildung des Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignales verhindert wurde. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass das nicht glycosylierte Procathepsin S-N104Q auf endocytotischen Wege das Lysosomen erreicht und dort reift.

Die detaillierte Untersuchung der Endocytose, insbesondere die Bindung von Procathepsin S-N104Q bei 2°C, der Nachweis kompetitiver Bindungsverhältnisse bei der Endocytose, die Tatsache, dass Procathepsin S, nicht aber reifes Cathepsin S endocytiert wird sowie die immunhistochemischen Ultrastrukturuntersuchungen beweisen, dass es sich bei der Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierung von Procathepsin S nicht um einen unspezifischen Mechanismus handelt. Unter Einsatz eines Crosslinkers konnten nach Zellfraktionierung Komplexe von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q und Membranproteinen aus der Membranpräparation immunpräzipitiert werden. Die Freisetzung von [<sup>35</sup>S]Procathepsin S-N104Q aus dem Komplex durch Spaltung des Crosslinkers beweist die Membranbindung. Künftige Untersuchungen sollten darauf gerichtet sein, das für die alternative Procathepsin S-N104Q-Bindung verantwortliche Bindungsprotein zu isolieren bzw. zu charakterisieren. Der skizzierte Versuchsansatz, insbesondere unter Verwendung [<sup>35</sup>S]vitalmarkierter HEK 293-Zellen, die Procathepsin S-N104Q exprimieren, stellen eine Möglichkeit dar, das Bindungsmotiv bei seiner Aufreinigung zu verfolgen.

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
1. Abzubauendes Material gelangt auf 3 Wegen in das prälysosomale / lysosomale Kompartiment (nach Alberts et al., 1994 „Molecular biology of the cell”)	4
2. Substratfluss in die Lysosomen (nach Luzio et al., 2000)	5
3. Organisation des endocytotischen Kompartimentes: frühe Endosomen, späte Endosomen, Lysosomen als Hauptkompartimente (nach Pillay et al., 2002)	7
4. Sortierung von lysosomalen Enzymen (nach Alberts et al., 1994 „Molecular biology of the cell”)	10
5. Struktur von humanem Cathepsin S	14
6. Mannose-6-Phosphat-abhängige und alternative Transportwege für die Sortierung lysosomaler Enzyme in das endosomale/lysosomale Kompartiment (nach Dittmer et al., 1999)	16
7. Einfluss von Ammoniumchlorid auf die Sekretion von Procathepsin S-N104Q und Wildtyp-Procathepsin S durch die entsprechenden HEK 293-Zell-Transfektanten	24
8. Strukturformel des homobifunktionellen Crosslinkers 3,3'-Dithiobis-[sulfosuccinimidylpropionat] (DTSSP) (Pierce)	32
9. Nachweis von Procathepsin S-N104Q und Proteinen in den Fraktionen der hydrophoben Interaktions-Chromatographie	38
10. Entfernung von Triton X100 aus wässrigen Lösungen durch BioBEADS	40
11. Entfernung von Triton X100 aus einer 250µM wässrigen Tritonlösung: Abhängigkeit von der eingesetzten Menge BioBEADS	40
12. Ausmaß der Bindung von Proteinen (BSA) an BioBEADS	41
13. Tritonentfernung aus einem [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q-Präparat nach Phenylsepharose-Chromatographie durch mehrfache (4x) BioBEADS-Behandlung	42
14. Nachweis von Procathepsin S-N104Q in den Fraktionen der Gelfiltration (HiLoad 26/60 Superdex G75)	43
15. Bindung und Endocytose von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur	46
16. Endocytose von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-Wildtyp durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	47
17. Endocytose von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.	48

18. Endocytose von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q durch HEK 293-Zellen, Einfluss der [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q-Konzentration	49
19. Bestimmung der Procathepsin S-N104Q-Konzentration mit Hilfe des ECL-Systems	51
20. Konkurrenz von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N und Procathepsin S-N bei der Endocytose in HEK 293-Zellen	52
21. Darstellung der in Abb. 20 bestimmten Hemmungen der Aufnahme von [ <sup>35</sup> S]Procathepsin S-N104Q (%) durch steigende Mengen an zugesetztem Procathepsin S-N104Q	53
22. Endocytose von biotinyliertem Procathepsin S und reifem Cathepsin S	55
23. Immunoblot-Analyse der isolierter Lysosomen von HEK 293-Zellen, die glykosyliertes und nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren	57
24. Immunhistochemischer Nachweis von Procathepsin S in HEK 293 Zellen, die mit der humanen Procathepsin S-cDNA transfiziert waren, mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie	58
25. Elektronenmikroskopische Aufnahme von HEK 293-Zellen, die glykosyliertes Procathepsin S exprimieren	59
26. Elektronenmikroskopische Aufnahme von HEK 293-Zellen, die nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren	59
27. Bindung von nicht glykosyliertem [ <sup>35</sup> S] Procathepsin S an intakte HEK 293-Zellen in Gegenwart des Crosslinkers DTSSP.	62
28. Bindung von nicht glykosyliertem [ <sup>35</sup> S] Procathepsin S an intakte, [ <sup>35</sup> S]vital-markierte HEK 293-Zellen, die nicht glykosyliertes Procathepsin S-N104Q exprimieren, in Gegenwart des Crosslinkers DTSSP.	64
29. Vergleich der konservierten Aminosäuren mit der Sequenz, für die eine Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierung nachgewiesen wurde	83
30. Strukturmodell von Procathepsin S	84

## **Tabellenverzeichnis**

	Seite
Tabelle 1: Effekt von BioBEADS auf die Konzentration von Triton X100 und Procathepsin S-N104Q	41
Tabelle 2: Konzentrierung von Procathepsin S-N104Q mit unterschiedlichen Membrantypen und Konzentrierungssystemen	45
Tabelle 3: Verteilung der $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität in der Lysosomen-Suspension	56

## Literaturverzeichnis

- Abraham D, Muir H, Olsen I and Winchester B (1985) Direct enzyme transfer from lymphocytes correct a lysosomal storage disease. *Biophys Res Commun* 129:417-425.
- Akasaki K, Michihara A, Jujiwara Y, Mibuka K and Tsuji (1996) Biosynthetic transport of major lysosome-associated membrane glycoprotein2, lamp-2: a significant fraction of newly synthesized lamp-2 is delivered to lysosomes by way of early endosomes. *J Biochem* 120:1088-1094.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD: *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing 3dEd New York & London (1994)
- Andrejewski N, Punnonen EL, Guhde G, Tanaka Y, Lüllman-Rauch R, Hartmann D, von Figura K and Saftig P (1999) Normal lysosome morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem* 274:12692-12701.
- Aniento F, Emans N, Griffiths G and Gruenberg J (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* 123: 373-1387.
- Authier F, Mort JS, Bell AW, Posner BI and Bergeron JJM (1995) Proteolysis of glucagon within hepatic endosomes by membrane-associated cathepsins B and D. *J Biol Chem* 270:15798-15807.
- Backer JM, Kahn CR and White MF (1990) The dissociation and degradation of internalized insulin occur in the endosomes of rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 265:14828-14835.
- Berg T, Gjøen T and Bakke O (1995) Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem J* 307:313-326.
- Borden LA, Einstein R, Gabel CA and Maxfield FR (1990) Acidification-dependent dissociation of endocytosed insulin precedes that of endocytosed proteins bearing the mannose 6-phosphate recognition marker. *J Biol Chem* 265:8497-8504.
- Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M and Levy MA (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K Expression, purification, activation and substrate identification. *J Biol Chem* 271:12517-12524.
- Braulke T, Mach L, Hoflack B and Glössl J (1992) Biosynthesis and Endocytosis of lysosomal enzymes in human colon carcinoma SW 1116 cells: impaired internalization of plasma membrane-associated cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Arch Biochem Biophys* 298:176-181.
- Bright NA, Reaves BJ, Mullock BM and Luzio, JP (1997) Dense core lysosomes fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles. *J Cell Sci* 110:2027-2040.

- Brömme D, Steinert A, Friebe S, Fittkau S, Wiederanders B and Kirschke H. (1989) The specificity of bovine spleen cathepsin S. A comparison with rat liver cathepsins L and B. *Biochem. J.* 264:475-481.
- Brömme D, Bonneau PR, Lachance P, Wiederanders B, Kirschke H, Peters C, Thomas DY, Storer AC and Vernet T (1993) Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 268:4832-4838.
- Burge V, Mainferme F and Wattiaux R (1991) Transient membrane association of the precursors of cathepsin C during their transfer into lysosomes. *Biochem J* 275:797-800.
- Capony F, Rougeot C, Montcourier P, Cavaillès V, Salazar G and Rochefort H (1989) Increased secretion, altered processing and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* 49:3904-3909.
- Capony F, Braulke T, Rougeot C, Roux S, Montcourier P and Rochefort H (1994) Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells. *Exp cell Res* 215:154-163.
- Ciechanover CA and Wiederanders B: Protein degradation in mammalian cells In: Higgins, SJ, Hames, BD (eds): *Post-translational processing - a practical approach*. Oxford University Press (1999): S. 225-264.
- Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H and Griffiths G (1998) Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. *J Biol Chem* 273:9842-9851.
- Claveau D and Riendeau D (2001) Mutations in the C-terminal end of cathepsin K affect proenzyme secretion and intracellular maturation. *Biochem. Biophys Res Commun* 281:551-557.
- Cuervo AM and Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273:501-503.
- Cuervo AM and Dice JF (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med* 76:6-12.
- Dahms NM, Lobel P and Kornfeld, S (1989) Mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 264:12115-12118.
- Dean MF and Martin JC (1988) Intracellular localization of  $\beta$ -glucuronidase in fibroblasts after direct sorting transfer from macrophages. *Biochem J* 256: 335-341.
- Delbrück R, Desel C, von Figura K and Hille-Rehfeld A (1994) Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur J Cell Biol* 64:7-14.
- DiCioccio RA and Miller AL (1993) Phosphorylation and subcellular location of l-fucosidase in lymphoid cells from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy. *Glycobiology* 3:489-495.



Diment S, Leech MS and Stahl PD (1988) Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem* 263:6901-6907.

Dittmer F, Ulbrich EJ, Hafner A, Schmahl W, Meister T, Pohlmann R and von Figura K (1999) Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci*,112:1591-1597.

Doherty JJ, Kay DG, Lai WH, Posner BI and Bergeron JJ (1990) Selective degradation of insulin within rat liver endosomes. *J Cell Biol* 110:35-42.

Driessen C, Bryant RAR, Lennon-Duménil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP, Chapman HA and Ploegh HL (1999) Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol* 147:775-790.

Duncan JR and Kornfeld S (1988) Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 106:617-629.

Dunn, KW and Maxfield, FR (1992) Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J Cell Biol* 117:301-310.

Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, von Figura K and Saftig, P (2002) Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* 13:3355-3368.

Fernandez PL, Farre X, Nadal A, Fernandez E, Peiro N, Sloane BF, Shi GP, Chapman HA, Campo E and Cardesa A (2001) Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma. *Int. J Cancer* 95:51-5.

Figarella C, Amouric M and Guy-Grotte (1988a) Role of lysosomes in pancreatic diseases. *Int J Pancreatol* 3:9-18.

Figarella C, Miszczuk-Jamska B and Barrett AJ (1988b) Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen I. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369:293-298.

Funato K, Beron W, Yang CZ, Mukhopadhyay A and Stahl PD (1997) Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *J Biol Chem* 272:16147-16151.

Gabel CA, Goldberg DE and Kornfeld S (1983) Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: evidence for an alternate pathway for lysosomal enzyme targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:775-779.

Gelb BD, Shi GP, Chapman HA and Desnick RJ (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273:1236-1238.

Geuze HJ, Stoorvogel W, Strous GJ, Slot JW, Bleekemolen JE and Mellman I (1988) Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytotic vesicles. *J Cell Biol* 107:2491-2501.

Gibson D, Flannery T, Mulligan K, Mirakhur M and McCormick D (2002) The role of the cysteine proteinase cathepsin S in astrocytoma invasion. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28:156

- Glickman JN und Kornfeld S (1993) Mannose-6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts- J Cell Biol 123:99-108.
- Glombitza GJ, Becker E, Kaiser HW and Sandhoff K (1997) Biosynthesis, processing, and intracellular transport of GM2 activator protein in human epidermal keratinocytes. The lysosomal targeting of the GM2 activator is independent of a mannose-6-phosphate signal. J Biol Chem 272:5199-5207.
- Goa, J, (1953) A micro biuret method for protein determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand J Clin Lab Invest 5:218-222.
- Gonzalez-Noriega A and Michalak C (2001) Mannose 6-phosphate-independent endocytosis of beta-glucuronidase. II. Purification of a cation-dependent receptor from bovine liver Biochim Biophys Acta 1538:152-161.
- Green SA and Kelly RB (1992) Low density lipoprotein receptor and cation-independent mannose 6-phosphate receptor are transported from cell surface to the Golgi apparatus at rates in PC12 cells. J Cell Biol 117:7-55.
- Griffiths G (1996) On vesicles and membrane compartments. Protoplasma 195: 37-58.
- Griffiths G and Gruenberg J (1991) The arguments for pre-existing early and late endosomes. Trends Cell Biol 1:5-9.
- Griffiths G, Matteoni R, Back R and Hoflack B (1990) Characterisation of the cation-independent mannose-6-phosphate-receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK-cells. J Cell Sci 95:441-461.
- Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I and Kornfeld S (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. Cell 52:329-341.
- Gruenberg J, Griffiths G and Howell KE (1989) Characterisation of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with assay of vesicle fusion in vitro. J Cell Biol 108:1301-1316.
- Gu F and Gruenberg J (1999) Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. FEBS-Letts 452:61-66.
- Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuerger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C and Deussing J (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. J Clin Invest 106:773-81.
- Halbhuber KJ, Hulsstaert CE, Feuerstein H and Zimmermann N (1994) Cerium as capturing agent in phosphatase and oxidase histochemistry In Progress in histochemistry and cytochemistry. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 28: 40-41
- Halbhuber KJ, Scheven C, Jirikowski G, Feuerstein H and Ott R (1996) Reflectance enzyme histochemistry (REH): visualization of cerium-based and DAB primary reaction products of phosphatase and oxidase in cryostat sections by confocal laser scanning microscopy. Histochem Cell Biol 105:239-249.

- Hall CW, Liebaers I, Di Natale P and Neufeld EF (1978) Enzymic diagnosis of the genetic mucopolysaccharide storage disorders. *Methods Enzymol.* 50:439-456.
- Hart TC, Hart PS, Bowden DW, Michalec MD, Callison SA, Walker SJ, Zhang Y and Firatli E (1999) Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillion-Lefevre syndrom. *J Med Genet* 36:881-887.
- Hasilik A and Neufeld EF (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblast Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem* 255:4937-4945.
- Hille-Rehfeld A (1995) Mannose-6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomale enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1241:177-194.
- Hirst J, Futter CE and Hopkins CR (1998) The kinetic of mannose-6-phosphate receptor trafficking in the endocytotic pathway in Hep-2 cells: the receptor enters and rapidly leaves multivesicular endosomes without accumulating in a prelysosomale compartment. *Mol Biol Cell* 9:809-816.
- Honey K and Rudensky AY (2001) Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nature Rev Immunology* 3:472-82.
- Hou WS, Li Z, Gordon RE, Chan K, Klein MJ, Levy R, Keysser M, Keyszer G and Bromme D (2001) Cathepsin K is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol* 156:2167-2177.
- Hou WS, Li W, Keyszer G, Weber E, Levy R, Klein MJ, Gravalles EM, Goldring SR and Bromme D (2002) Comparison of cathepsin K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* 46:663-674.
- Hou WS, Bromme D, Zhao Y, Mehler E, Dushey C, Weinstein H, Miranda CS, Fraga C, Greig F, Carey J, Rimoin DL, Desnick RJ and Gelb BD (1999) Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J Clin Invest* 103:731-8.
- Hsieh CD, deRoos P., Honey K, Beers C and Rudensky AY (2002) A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J Immun* 168:2618-2625.
- Huete-Pérez J, Engel JC, Brinen LS, Mottram JC and McKerrow JH (1999) Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain prtoein motif. *J Biol Chem* 274:16249-16256.
- Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M and Kokubo T (1995) Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine protease predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 206:89-96.
- Jadot M, Dubois F, Wattiaux-De Connick S and Wattiaux R (1997) Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur J Biochem* 249:862-869.
- Jahraus A, Tjelle TE, Berg T, Habermann A, Storrie B, Ullrich O and Griffiths G (1998) In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J441 macrophages. *J Biol Chem* 273:30379-30390.

- Karrer KM, Peiffer SL and DiTomas ME (1993) Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci* 90:3063-306.
- Kasper, D, Dittmer, F, von Figura, K, Pohlmann, R (1996) Neither type of mannose-6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J Cell Biol* 134:615-623.
- Kaulmann G, Palm GJ, Schililing K, Hilgenfeld R and Wiederanders B (2003) An unfolding/refolding step helps the crystallization of a poorly soluble protein. *Acta Cryst D* 59 im Druck.
- Kessler SW (1981) Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. *Methods Enzymol* 73:442-459.
- Kirschke H, Locnikar P and Turk V (1984) Species variations amongst lysosomal cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 174:123-127.
- Kirschke H, Barrett AJ and Rawlings ND: Protein profile of lysosomal cysteine proteases. 2ed Oxford Univers Press, Oxford (1998)
- Kirschke H, Wiederanders B, Brömme D and Rinne A (1989) Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem. J.* 264:467-473
- Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, von Figura K and Uchiyama Y (2000) Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* 20:6898-6906.
- Kornfeld S and Mellman I (1989) The biogenesis of lysosomes. *An Rev Cell Biol* 5:483-525.
- Köster A, von Figura K and Pohlmann R (1994) Mistargeting of lysosomal enzymes in Mr(r) 46,000 mannose 6-phosphate receptor-deficient mice is compensated by carbohydrate-specific endocytotic receptor. *Eur J Biochem* 224:685-695.
- Köster A, Saftig P, Matzner U, von Figura K, Peters C and Pohlmann R (1993) Targeted disruption of the M( r ) 46,000 mannose-6-phosphate receptor gene in mice results in misrouting of lysosomal proteins. *EMBO J* 12:5219-5223.
- Kreusch S, Fehn M, Maubach G, Nissler K, Rommerskirch W, Schilling K, Weber E, Wenz I and Wiederanders B (2000) An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *Eur J Biochem* 267:2965-2972.
- Krueger S, Haeckel C, Buehling F and Roessner A (1999) Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and mobility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res* 59:6010-6014.
- Kuliawat R and Arvan P (1994) Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J Cell Biol* 126:77-86.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Laurent-Matha V, Farnoud MR, Lucas A, Rougeot C, Garcia M and Rochefort H (1998) Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors. *J Cell Sci* 111:2539-2549.

Laurent-Matha V, Lucas A, Huttler S, Sandhoff K, Garcia M and Rochefort H (2002) Procathepsin D interacts with prosaposin in cancer cells but its internalization is not mediated by LDL receptor-related protein. *Exp Cell Res* 277:210-219.

Lawrence BP and Brown WJ (1992) Autophagic vacuoles rapidly fused with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J Cell Sci* 102:515-526.

Leroy JG and DeMars RI (1967) Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts. *Science* 157:804-806.

Ludwig T, Griffiths G and Hoflack B (1991) Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytotic pathway of normal rat kidney cells. *J Cell Biol* 115:1561-1572.

Ludwig T, Munier-Lehmann H, Bauer U, Hollinshead M, Ovitt C, Lobel P and Hoflack B (1994) Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *EMBO J* 13:3430-3437.

Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM and Piper RC (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113:1515-1524.

Luzio JR, Mullock BM, Pryor PR, Lindsay MR, James DE and Piper RC (2001) Relationship between endosomes and lysosomes. *Biochem Soc Trans* 29:476-480.

Mach L, Mort JS and Glössl J (1994) Maturation of human procathepsin B Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem* 269:13030-13035.

Mach L, Schwihla H, Stüwe K, Rowan AD, Mort J S and Glössl J (1993) Activation of procathepsin B in human hepatoma cells: the conversion into the mature enzyme relies on the action of cathepsin B itself. *Biochem J* 293:437-442.

Mainferme, F, Wattiaux, R and von Figura, K (1985) Synthesis, transport and processing of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 153:211-216.

Mason RW und Massey SD (1992) Surface activation of procathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1659-1666.

Maubach G, Schilling K, Rommerskirch W, Wenz I, Schultz JE, Weber E and Wiederanders B (1997) The inhibition of cathepsin S by its propeptide – specificity and mechanism of action. *Eur J Biochem* 250:745-750.

- Mathieu M, Vignon F, Capony F and Rochefort H (1991) Estradiol down-regulates the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor gene and induces cathepsin-D in breast cancer cells: a receptor saturation mechanism to increase the secretion of lysosomal proenzymes. *Mol. Endocrin* 5:815-822.
- McIntyre GF and Erickson AH (1991) Procathepsins L and D are membrane-bound in acidic microsomeal vesicles. *J Biol Chem* 266:15438-15445.
- McIntyre GF and Erickson AH (1993) The lysosomal proenzyme receptor that binds procathepsin L to microsomeal membranes at pH 5 is a 43-kDa integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci* 90:10588-10592.
- McIntyre GF and Erickson AH and Godbold GD (1994) The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *J Biol Chem* 269:567-572.
- McQueney MS, Amegadzie BYKDA, D'Alessio K, Hanning CR, McLaughlin MM, McNulty D, Carr SA, James C, Kurdyla J and Jones CS (1997) Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* 272:13955-13960.
- Mellmann I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *An Rev Cell Dev Biol* 12:575-625.
- Merril CR, Dunau ML and Goldmann D (1981) A rapid and sensitive silver staining for polypeptides in polyacrylamide gels. *Analyt Biochem* 110:201-207.
- Moin K, Demchik L, Mai J, Duessing J, Peters C and Sloane BF (2000) Observing proteases in living cells. *Adv Exp Med Biol* 477:391-401.
- Motyckova G and Fisher DE (2002) Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. *Curr Mol Med* 2:407-421.
- Muschol N, Matzner U, Tiede S, Gieselmann V, Ullrich K and Braulke T (2002) Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages. *Biochem J* 368:845-853.
- Muentener K, Zwicky R, Csucs G and Baici A (2003) The alternative use of exon 2 and 3 in cathepsin B mRNA controls enzyme trafficking and triggers nuclear fragmentation in human cells. *Histochem Cell Biol* 119:93-101.
- Mullock BM, Perez JH, Kuwana T, Gray SR and Luzio JP (1994) Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from rat liver. *J Cell Biol* 126:1173-1182.
- Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR and Luzio JP (1998) Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Sci* 110:591-601.
- Munger JS, Haass C, Lemere CA, Shi GP, Wong WS, Teplow DB, Selkoe DJ and Chapman HA ((1995) Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S. *Biochem J* 311:299-305.

Murphy RF (1991) Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol* 1:77-82.

Nägler DK, Sulea T and Menard R (1999) Full lenght cDNA of human cathepsin F predicts the presence of a cystatin domain at the N-terminus of the cysteine protease zymogen. *Biochem Biophys Res Commun* 257:313-318.

Nakagawa TY and Rudensky AY (1999a) The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172:121-129.

Nakagawa TY, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C and Rudensky AY (1998) Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280:450-3.

Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA and Rudensky AY (1999b) Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10:207-17.

Nakano A, Nomura K, Nakano H, Ono Y, LaForgia S, Pulkkinen L, Hashimoto I and Uitto J (2001) Papillon-Lefevre syndrome: mutations and polymorphisms in the cathepsin C gene. *J Invest Dermatol* 116:339-343.

Neufeld EF and McKusick VA (1993) Disorders of lysosomal enzyme synthesis and localization: I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy. Stanbury JB, Wijngaarden TB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds *The Metabolic Basis of Inherited Disease* New York: McGraw-Hill, 778-787.

Neufeld EF, Lim TW and Shapiro LJ (1975) Inherited disorders of lysosomal metabolism. *An Rev Biochem* 44:357-376.

Nishimura Y and Himeno M (1995) Cathepsin D associates with lysosomal membranous protein. *Biol Pharm Bull* 18:1340-1346.

Nishimura Y, Kawabata T, Furuno K and Kato K (1989). Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing of procathepsin L in lysosomes. *Arch Biochem Biophys* 271:400-406.

Nissler K, Kreusch S, Rommerskirch W, Strubel W, Weber E and Wiederanders B (1998) Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells. *Biol Chem* 379:219-224.

Nissler K, Strubel W, Kreusch S, Rommerskirch W, Weber E and Wiederanders B (1999) The half-life of human procathepsin S. *Eur J Biochem* 263:717-725.

Nissler K, Oehring H, Krieg R, Pierskalla A, Weber E, Wiederanders B and Halbhuber KJ (2002) Cytochemical demonstration of expression and distribution of non-glycosylated human lysosomal cathepsin S in HEK 293 cells. *Cell Mol Biol* 48:297-308.

Ohkuma S and Poole B (1978) Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3327-3331.

Olsen I, Dean MF, Harris G and Muir H (1981) Direct transfer of a lysosomal enzyme from lymphoid cells to deficient fibroblasts. *Nature* 291:244-247.

Olsen I, Muir H, Smith R, Fensom A and Watt DJ (1983) Direct two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J Biol Chem* 270:27311-27318.

Owada M and Neufeld EF (1982) Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose-6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. *Biochem Biophys Res Commun* 105:814-820.

Pillay CS, Elliot E and Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363:417-429.

Piper RC and Luzio JP (2001) Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2:612-621.

Pluger EB, Boes M, Alfonso C, Schroter CJ, Kalbacher H, Ploech HL and Driessen C (2002) Specific role for cathepsin S in the generation of antigenic peptides in vivo. *Eur J Immun* 32:467-476.

Pohlmann R, Krüger S, Hasilik A, and von Figura K (1984) Effect of monensin on intracellular transport and receptor-mediated endocytosis of lysosomal enzymes. *Biochem J* 217:649-658

Pohlmann R, Wendland M, Boeker C and von Figura K (1995) The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complement of lysosomal proteins. *J Biol Chem* 270:27311-27318.

Reddy VY, Zhang QY and Weiss SJ (1995) Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsin B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 92:3849-3853.

Reinheckel TR, Deussing J, Roth Q and Peters C (2001) Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem* 382:735-741.

Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL and Chapman HA (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*. 4:357-66.

Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos JA, Shi GP, Palmer JT, Karp ER, DeSanctis GT, Ploegh, HL and Chapman HA (1998) Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* 101:2351-2363.



Rijnboutt S, Stoorvogel W, Geuze HJ and Strous GJ (1992) Identification of subcellular compartments involved in biosynthetic processing of cathepsin D. *J Biol Chem* 267:15665-15672.

Rijnboutt S, Kal JK, Geuze HJ, Aetrs H and Strous GJ (1991) Mannose-6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem* 266:23586-23592.

Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, von Figura K, Paus R and Peters C (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 14:2075-2086.

Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, Suter A and von Figura K (2000) Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol* 477:293-303.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P and von Figura K (1998) Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteoporosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13453-13458.

Sahagian GG and Neufeld EF (1983) Biosynthesis and turnover of the mannose 6-phosphate receptor in cultured chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 258:7121-7128.

Sajid M and McKerrow JH (2002) Cysteine proteases of parasitic organism. *Mol Biochem Parasitol* 120:1-21.

Salminen A und Gottesman MM (1990) Inhibitor studies indicate that active cathepsin L is probably essential to its own processing in cultured fibroblasts. *Biochem J* 272:39-44.

Schmid SL, Fuchs R, Male P and Mellman I (1988) Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* 52:73-83

Schmid SL, Fuchs R, Kielian M, Helenius A and Mellman I (1989) Acidification of endosome subpopulations in wildtype Chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants. *J. Cell Biol* 108:1291-1300.

Shi GP, Munger JS, Meara PJ, Rich DH and Chapman HA (1992) Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* 267:7258-7262.

Shi GP, Webb AC, Foster KE, Knoll JHM, Lemere CA, Munger JS and Chapman HA (1993) Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution *J Biol Chem* 269:11530-11536.

Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL and Chapman, HA (1999) Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10:197-206.

Shi GP, Sukhova GK, Kuzuya M, Ye Q, Du J, Zhang Y, Pan JH, Lu ML, Cheng XW, Iguchi A, Perrey S, Lee AM, Chapman HA and Libby P. (2003) Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res* 92:493-500.

Stein M, Zijderhand-Bleekemolen JE, Geuze H, Hasilik A and von Figura K (1987a) Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *EMBO J* 6:2677-2681.

Stein M, Braulke T, Krentler C, Hasilik A and von Figura K (1987b) 46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 368:937-947.

Storrie B (1988) Assembly of lysosomes: perspectives from comparative molecular biology. *Int Rev Cytol* 111:53-105.

Storrie B and Desjardins M (1996) The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bio Essays* 18:895-903.

Stypman J, Glaser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R, Monnig G, Haverkamp W, Breithardt G, Schmahl W, Peters C and Reinheckel T (2002) Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc Nat. Acad Sci USA* 99:6234-6239.

Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P and Shi GP. (2003) Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 111:897-906.

Taketa K (1987) A tetrazolium method for peroxidase staining: application to the antibody-affinity blotting of  $\alpha$ -fetoprotein separated by lectin affinity electrophoresis. *Electrophoresis* 8:409-414.

Tanaka Y, Tanaka R and Himeno M (2000a) Lysosomal cysteine protease, cathepsin H, is targeted to lysosomes by the mannose-6-phosphate-independent system in rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 23:805-809.

Tanaka Y, Tanaka R, Kawabata T, Noguchi Y and Himeno M (2000b) Lysosomal cysteine protease, cathepsin B, is targeted to lysosomes by the mannose 6-phosphate-independent pathway in rat hepatocytes: site-specific phosphorylation in oligosaccharides of the proregion. *J Biochem* 128:39-48.

Thilo L, Stroud E and Haylett T (1995) Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. *J Cell Sci* 108:1791-1803.

Tikkanen R, Enomaa A, Riikonen A, Ikonen E and Peltonen L (1995) Intracellular sorting of aspartatglucosaminidase: the role of N-linked oligosaccharides and evidence of Manose-6-phosphate-independent lysosomal targeting. *DNA Cell Biol* 14: 305-312.

Tjelle ET, Brech A, Juvet LK, Griffiths G and Berg T (1996) Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes, and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J Cell Sci* 109:2905-2914.

- Tobin DJ, Foitzik K, Reinheckel T, Mecklenburg L, Botcharev VA, Peters C and Paus R (2002) The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 160:1807-1821.
- Tsuji A, Omura K and Suzuki Y (1988) I-cell disease: evidence for a mannose-6-phosphate independent pathway for translocation of lysosomal enzymes in lymphoblastoid cells. *Clin Chim Acta* 176:115-121.
- Turk B, Turk D and Turk V (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477:98-111.
- Turnsek T, Kregar I and Lebez D (1975) Acid sulphydryl protease from calf lymph nodes. *Biochim. Biophys. Acta.* 403:514-520.
- Varki AP, Reitman, ML and Kornfeld S (1981) Identification of a variant of mucopolidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7773-7777.
- Vielhaber G, Hurwitz R and Sandhoff K (1996) Biosynthesis, processing and targeting of sphingolipid aktivator protein (SAP) precursor in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 271:32438-32446.
- Villadangos JA, Riese RJ, Peters C, Chapman HA and Ploegh HL (1997) Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsin S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J Exp Med* 186:549-560.
- von Figura K und Hasilik A (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann Rev Biochem* 55:167-193.
- Waheed A, van Etten RL, Koob R and Drenckhahn D (1988) Targeting of phosphomannosyl-deficient arylsulfatase A to lysosomes of I-cell fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 45:262-267.
- Ward DM, Leslie JD and Kaplan J (1997) Homotypic lysosome fusion in macrophages: analysis using an in vitro assay. *J Cell Biol* 139:665-673.
- Wetzker R, Klinger R, Hsuan J, Fry MJ, Kauffmann-Zeh A, Müller E, Frunder H and Waterfield M (1991) Purification and characterization of phosphatidylinositol-4-kinase from human erythrocyte membranes. *Eur J Biochem* 200:179-185.
- Wiederanders B, Brömme D, Kirschke H, von Figura K, Schmidt B and Peters C (1992) Phylogenetic conservation of cysteine proteinases (cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S) *J Biol Chem* 267:13708-13713.
- Wiederanders B, Brömme D, Kirschke H, Kalkkinnen N, Rinne A, Paquette T and Toothman P (1991) Primary structure of bovine cathepsin S – Comparison to L, H, B and papain. *FEBS Letts* 286:189-192.
- Wolters PJ and Chapman HA (2000) Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir Res* 1:170-177.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis Juni 2003 am Institut für Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Direktor Prof. Dr. B. Wiederanders, angefertigt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. K. Nissler, meinem Doktorvater dieser Arbeit, der nicht nur durch zahlreiche fachliche Anregungen bis in die Endphase hinein die Gestaltung dieser Arbeit wesentlich beeinflusst hat. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, für die wertvollen Diskussionen, die mich sowohl fachlich und persönlich bereicherten, für die Bereitschaft, jederzeit ansprechbar zu sein und für ein sehr angenehmes und produktives Arbeitsklima.

Prof. Dr. Wiederanders danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für seine kritischen und konstruktiven Diskussionen und für die Gelegenheiten zur Darstellung meiner Ergebnisse im In- und Ausland.

Prof. Dr. Halbhuber und seinen Mitarbeitern, Institut für Anatomie 2 der Friedrich-Schiller-Universität, danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen der ultra-strukturellen Untersuchungen.

Bei Dr. Weber in Halle bedanke ich mich für die Bereitstellung des Cathepsin S-Antikörpers vom Kaninchen ("Sascha").

Ich danke den vielen Personen des Institutes, die auf unterschiedlicher Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau Schade und Frau Seul für ihre äußerst zuverlässige technische Unterstützung sowie Frau Dr. I. Wenz für die Bereitstellung des reifen Enzyms.

Bei meinen Eltern, Dr. Wolfgang und Bettina Pierskalla, möchte ich mich für die vielseitige Unterstützung meines Studiums bedanken.

## Lebenslauf

Name : Pierskalla, Alexandra

Anschrift : Pacelliallee 2, 36043 Fulda

Familienstand : ledig

Geburtsdatum : 27.08.1977

Geburtsort : Halle/Saale

09/1984 – 07/1987 : POS Halle/Saale

09/1987 – 07/1992 : OS Dresden

09/1992 – 07/1996 : Gymnasium Bad Berka

07/1996 : Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

08/1996 - 09/1996 : Ausbildung zur Kinderkrankenschwester am Klinikum der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abbruch für Studium

10/1996- 06/2003 : Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität  
Jena

11/1999 : Beginn der Dissertationsarbeit am Institut für Biochemie I der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

06/2003 : Staatsexamen und Approbation in der Fachrichtung  
Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

07/2003 : Beginn der ärztlichen Tätigkeit als „Ärztin im Praktikum“ am  
Klinikum Fulda, Klinik für Neurologie und klinische  
Neurophysiologie

Fulda, 17.12.2003

Alexandra Pierskalla

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. K. Nissler, Prof. Dr. B. Wiederanders,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Fulda, 17.12.2003

Alexandra Pierskalla, Verfasserin

## **Veröffentlichungen**

Nissler K, Oehring H, Krieg R, Pierskalla A, Weber E, Wiederanders B and Halbhuber KJ (2002) Cytochemical demonstration of expression and distribution of non-glycosylated human lysosomal cathepsin S in HEK 293 cells. Cell Mol Biol 48:297-308.

## **Präsentationen**

International Conference on Cysteine Proteinase and their Inhibitors, 14-18.09.2002,  
Portoroz, Slowenien  
Posterpräsentation  
Targeting of human cathepsin S in HEK 293-cells  
K. Nissler, A. Pierskalla, E. Weber, K. Halbhuber, B. Wiederanders

6. Jenaer Proteolysetag, 23.11.2001, Eisenberg  
Vortrag  
Sortierung von Cathepsin S in HEK 293-Zellen  
A. Pierskalla